

Philipps



Universität
Marburg

Entfaltung ist essentiell für die Translokation löslicher Proteine
über die Membran der parasitophoren Vakuole im
Plasmodium falciparum-infizierten Erythrozyten

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nina Gehde
aus Berlin

Marburg/Lahn 2008

Philipps



Universität
Marburg

Entfaltung ist essentiell für die Translokation löslicher Proteine
über die Membran der parasitophoren Vakuole im
Plasmodium falciparum-infizierten Erythrozyten

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nina Gehde
aus Berlin

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
23.12.2008 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe G. Maier

Tag der mündlichen Prüfung am:

Aus der vorliegenden Arbeit ist folgende Publikation entstanden:

Gehde N, Hinrichs C, Montilla I, Charpian S, Lingelbach K, Przyborski JM. Protein unfolding is an essential requirement for transport across the parasitophorous vacuolar membrane of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*. 2008.

I. Inhaltsverzeichnis

II.	Abkürzungsverzeichnis.....	5
III.	Zusammenfassung.....	6
1.	Einleitung.....	7
1.1	<i>Plasmodium falciparum</i>	7
1.1.1	Die Epidemiologie.....	7
1.1.2	Der Lebenszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	9
1.1.2.1	Die Entwicklungsschritte in der Mücke.....	10
1.1.2.2	Die Entwicklungsschritte im Menschen.....	11
1.1.3	Postinvasive Modifikationen der Wirtszelle.....	15
1.1.3.1	Die parasitophore Vakuole (PV).....	15
1.1.3.2	Das Tubovesikuläre Netzwerk (TVN) und die Maurerschen Spalten (MC).....	16
1.1.3.3	Die Rolle exportierter Proteine in der Pathogenese der Malaria... ..	18
1.2	Transportprozesse.....	19
1.2.1	Transport in das Endoplasmatische Retikulum.....	19
1.2.2	Der Transport zwischen ER und Golgi-Apparat.....	21
1.2.3	Transport zur Parasitophoren Vakuole und über die PVM in die Wirtszelle.....	22
1.2.4	Transportmodelle.....	23
1.2.5	Voraussetzungen für einen Transport in die Wirtszelle.....	25
1.2.6	Generelle Translokationsmechanismen.....	27
1.3	Die Verwendung der Dihydrofolat Reduktase bei Proteinfaltungs-Analysen... ..	29
1.4	Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	31
2.	Material und Methoden.....	32
2.1	Material.....	32
2.1.1	Geräte.....	32
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Glaswaren.....	33
2.1.3	Chemikalien.....	34
2.1.4	Antikörper und Seren.....	36
2.1.5	Enzyme.....	36
2.1.6	Plasmide.....	37
2.1.7	Oligonukleotide.....	37
2.1.8	Molekularbiologische Kits und Reagenzien.....	38

2.1.9	Größenmarker und Ladepuffer	38
2.1.10	Puffer und Lösungen	38
2.1.11	Medien für die Kultivierung der <i>E. coli</i> Zellen	40
2.1.12	Medien und Reagenzien für die Kultivierung der <i>P. falciparum</i> Zellen ..	41
2.1.13	Zellen und Organismen	41
2.2	Methoden	42
2.2.1	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	42
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	42
2.2.1.2	Mini-, Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> ..	42
2.2.1.3	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	42
2.2.1.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	43
2.2.2	Arbeiten mit den Blutstadien von <i>Plasmodium falciparum</i>	43
2.2.2.1	Kultivierung, Synchronisation und Anreicherung von <i>P. falciparum</i> ..	43
2.2.2.2	Stabile Transfektion von <i>P. falciparum</i> -Blutstadien	44
2.2.2.3	Cryopräservierung und Auftauen von <i>P. falciparum</i> Blutstadien ...	45
2.2.2.4	Differentieller Aufschluss von infizierten Erythrozyten mittels Streptolysin O und Saponin	46
2.2.2.5	Behandlung der iRBZ mit dem Pilzmetabolit Brefeldin A (BFA)	47
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	48
2.2.3.1	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	48
2.2.3.2	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	49
2.2.3.3	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	50
2.2.3.4	Agarosegelelektrophorese von DNA	51
2.2.3.5	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	52
2.2.3.6	Präzipitation von DNA	52
2.2.3.7	Restriktion von DNA	53
2.2.3.8	Insertion von DNA-Sequenzen in Plasmide	53
2.2.3.9	Kolonie-PCR	54
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	54
2.2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
2.2.4.2	Semi-Dry-Immunoblotting nach Towbin <i>et al.</i> , 1979	55
2.2.4.3	Protease-Protektions-Assay	56
2.2.4.4	Ultrazentrifugation infizierter Erythrozyten	57
2.2.4.5	Fluoreszenzmikroskopie	57

2.2.4.6	<i>In vivo</i> SLO-Lyse infizierter Erythrozyten.....	58
2.2.4.6	Immunfluoreszenz-Assay (IFA) nach Tonkin	58
2.2.4.7	Bildbearbeitung mittels Image J.....	59
3.	Ergebnisse	60
3.1	Das DHFR Fusionsprotein-System für die Untersuchung des Faltungszustandes während der Proteintranslokation über die PVM.....	60
3.1.1	Generierung der Fusionsprotein-exprimierenden Parasitenstämme	61
3.1.2	Etablierung des DHFR Fusionsprotein-Systems	63
3.1.3	Stabilisierung des Fusionsprotein DG durch das Folat-Analog Aminopterin (AP)	64
3.1.4	Eine Stabilisierung des Fusionsproteins erfolgt auch durch die Zugabe des Folat-Analogs WR99210.....	68
3.2	Untersuchung des Einflusses einer Stabilisierung zweier DHFR- Fusionsproteine auf den Transport <i>in vivo</i>	71
3.2.1	Der Transport des Fusionsproteins, bestehend aus den ersten 80 AS von STEVOR, DHFR und GFP, wird durch eine Stabilisierung in der PV arretiert	71
3.2.2	Auch der Transport des Fusionsproteins, bestehend aus den ersten 150 AS von GBP130, DHFR und GFP, wird durch eine Stabilisierung in der PV arretiert	75
3.3	Die Stabilisierung des Fusionsproteins ist abhängig von der Konzentration des eingesetzten Folat-Analogs.....	79
3.4	Das Fusionsprotein bildet in der Anwesenheit von WR keine Aggregate und verhält sich wie ein lösliches Protein	81
3.5	Die Arretierung ist keine Folge einer Überexpression des Fusionsproteins	83
3.6	Bei der <i>in vitro</i> -Stabilisierung des DHFR-Anteils durch WR99210 handelt es sich um einen reversiblen und dynamischen Prozess.....	86
3.7	Nur neu synthetisierte Proteine können über die Membran der parasitophoren Vakuole transloziert werden	89
3.8	GDG exprimierende Zellen beinhalten nachweisbare Mengen an nicht- fluoreszierendem Fusionsprotein innerhalb der parasitophoren Vakuole ...	91

4. Diskussion.....	96
4.1 Ausblick	101
 IV. Literaturverzeichnis.....	 102
V. Abbildungsverzeichnis.....	113
VI. Tabellenverzeichnis.....	114

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	nm	Nanometer
Ak	Antikörper	OD	Optische Dichte
Amp	Ampicillin	P	Pellet
AP	Aminopterin	PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
AS	Aminosäure	PPM	Parasitenplasmamembran
ATP	Adenosintriphosphat	PV	Parasitophore Vakuole
BFA	Brefeldin A	PVM	Parasitophore Vakuolenmembran
bp	Basenpaare	RBZ	Rote Blutzelle
bzw.	Beziehungsweise	RPM	Umdrehungen pro Minute
ca.	Circa	RT	Raumtemperatur
DHFR	Dihydrofolatreduktase	Sek.	Sekunden
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SERP	Serin reiches Protein
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	SLO	Streptolysin O
ECL	Enhanced Chemiluminescence	STEVR	Subtelomeric-open reading frame
EPM	Erythrozytenplasmamembran	TVN	Tubovesikuläres Netzwerk
ER	Endoplasmatisches Retikulum	U	Unit (Einheit)
GBP	Glykophorin bindendes Protein	Vol.	Volumen
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	w/v	Gewicht / Volumen
h	Stunde	WR	WR99210
HE	Hämolytische Einheit	z.B.	zum Beispiel
HRP	Horse Raddish Peroxidase		
HSP	Hitze-Schock Protein		
iRBZ	infizierte rote Blutzellen		
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		
KV	Kilovolt		
mA	Milli-Ampère		
MC	Maurersche Spalten		
Min	Minuten		
µl	Mikroliter		

III. Zusammenfassung

Der humanpathogene Parasit *Plasmodium falciparum* transportiert während seines erythrozytären Entwicklungszyklus eine große Anzahl parasitärer Proteine in seine Wirtszelle, die eine Vielzahl an Modifikationen bewirken und dadurch das Überleben des Parasiten sichern. Diese Proteine müssen dabei nicht nur über die parasitäre Plasmamembran transportiert werden, sondern auch die parasitophore Vakuole überqueren, die während der Invasion gebildet wird und innerhalb derer sich der Parasit entwickelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein DHFR-Fusionsprotein-System etabliert und angewendet, um den Effekt des Faltungszustandes zweier Proteine auf den Transport über die Membran der parasitophoren Vakuole zu untersuchen. Dieses System basiert auf der Grundlage, dass Fusionsproteine, die das murine DHFR beinhalten, durch den Einsatz eines Folat-Analogs in ihrer Faltung stabilisiert werden können. Durch Zellfraktionierung und durch mikroskopische Analysen konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Proteine in ihrer gefalteten Konformation nicht über die PVM transportiert wurden und in der PV akkumulierten.

Die Ergebnisse der Arbeit sprechen dafür, dass sich lösliche Proteine während einer Translokation über die PVM in einer entfalteten und somit translokationskompetenten Konformation befinden müssen. Ferner unterstützen sie nicht nur das 2-Schritt-Modell für den Transport löslicher Proteine in das Zytoplasma der Wirtszelle, sondern auch die Existenz eines Translokons innerhalb der PVM, für dessen Funktion eine Entfaltung der zu transportierenden Proteine essentiell ist.

1. Einleitung

Ende 2000 fand das bis *dato* größte Gipfeltreffen der Vereinten Nationen in New York statt, an dem Vertreter von 189 Ländern teilnahmen. Dabei wurde die Millenniumserklärung verabschiedet, aus der sich acht Entwicklungsziele ableiteten. Eines dieser erklärten Ziele ist die Bekämpfung der drei Krankheiten, an denen vornehmlich die armen Bevölkerungsschichten in Entwicklungsländern zu leiden haben: Aids, Tuberkulose und Malaria.

Bis zum Jahr 2015 soll die Ausbreitung von Malaria zum Stillstand gebracht werden und ein tendenzieller Rückgang an Neuerkrankungen zu verzeichnen sein (Snow *et al.*, 2008).

Dieser Erfolg würde sich auf einer nunmehr 135 jährigen stetigen Erforschung der Malariaerreger begründen, die mit dem Arzt Alphonse Laveran ihren Anfang fand. Dieser konnte 1880 erstmals in einem Blutaussstrich den parasitischen Protozoen der Gattung *Plasmodium* nachweisen.

1.1 *Plasmodium falciparum*

1.1.1 Die Epidemiologie

Nur fünf der fast 120 bekannten *Plasmodien*-Arten zählen zu den humanpathogenen Erregern der Malaria. *Plasmodium malariae*, als Verursacher der Malaria quartana, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax*, die die Krankheit Malaria tertiana bewirken, sowie der Erreger der Malaria tropica *Plasmodium falciparum*. Auch für *Plasmodium knowlesi*, dessen natürlicher Wirt der Javaneraffe ist, konnte nun gezeigt werden, dass er beim Menschen Malaria verursachen kann. Diese Form der Malaria findet sich bevorzugt im Süd-Ost-Asiatischen Raum (Cox-Singh und Singh, 2008, Pain *et al.*, 2008). *P. falciparum* wird als klinisch bedeutendster Vertreter seiner Gattung betrachtet, da die Malaria tropica die schwerste Form dieser Infektionskrankheit darstellt. Beispielsweise sind südlich der Sahara bis zu 90% der Malaria-Erkrankungen auf den Parasiten *P. falciparum* zurückzuführen.

Die Übertragung von *P. falciparum* auf den Menschen findet während einer Blutmahlzeit durch die weibliche Mücke der Gattung *Anopheles* statt. Neueste Schätzungen gehen davon aus, dass 2007 weltweit etwa 2,37 Mrd. Menschen in Transmissions-Risiko-Regionen mit *P. falciparum* leben, wobei sich die räumliche Fläche einer Übertragung auf ca. 40 Mio. km² eingrenzen lässt (Guerra *et al.*, 2008). Die Verbreitung der Parasiten ist dabei eng an das Vorkommen des Vektors geknüpft, zu dessen Lebensräumen warme Sumpf- und Feuchtgebiete, sowie stehende Gewässer zählen. Die Erhebungen konnten zeigen, dass *P. falciparum* in 87 Ländern endemisch vorkommt, wobei zwischen einer stabilen und einer unstabilen Malaria unterschieden wird. Dabei ist eine stabile Malaria als mindestens ein klinischer Fall pro 10.000 Einwohnern pro Jahr in einer gegebenen administrativen Einheit definiert (Hay *et al.*, 2008). Insgesamt wird die *falciparum*-Malaria durch die WHO in acht verschiedene epidemiologische Zonen unterteilt. So existiert z.B. die Malaria der Savannengebiete Afrikas, die eine stabile Malaria mit mehr als 50% Betroffenen aufweist und die Kriegszonenmalaria, bei der die Parasitose aus dem Zusammenbruch der Gesundheitseinrichtungen und der Kontrollmaßnahmen resultiert. Diese Unterteilung kann dabei nicht starr betrachtet werden, sondern ist vielmehr ein Zusammenwirken verschiedenster Faktoren wie z.B. die Demographie der ansässigen Bevölkerung, vorhandene bzw. fehlende Entwicklungsprojekte, aber auch Klima und Ökologie.

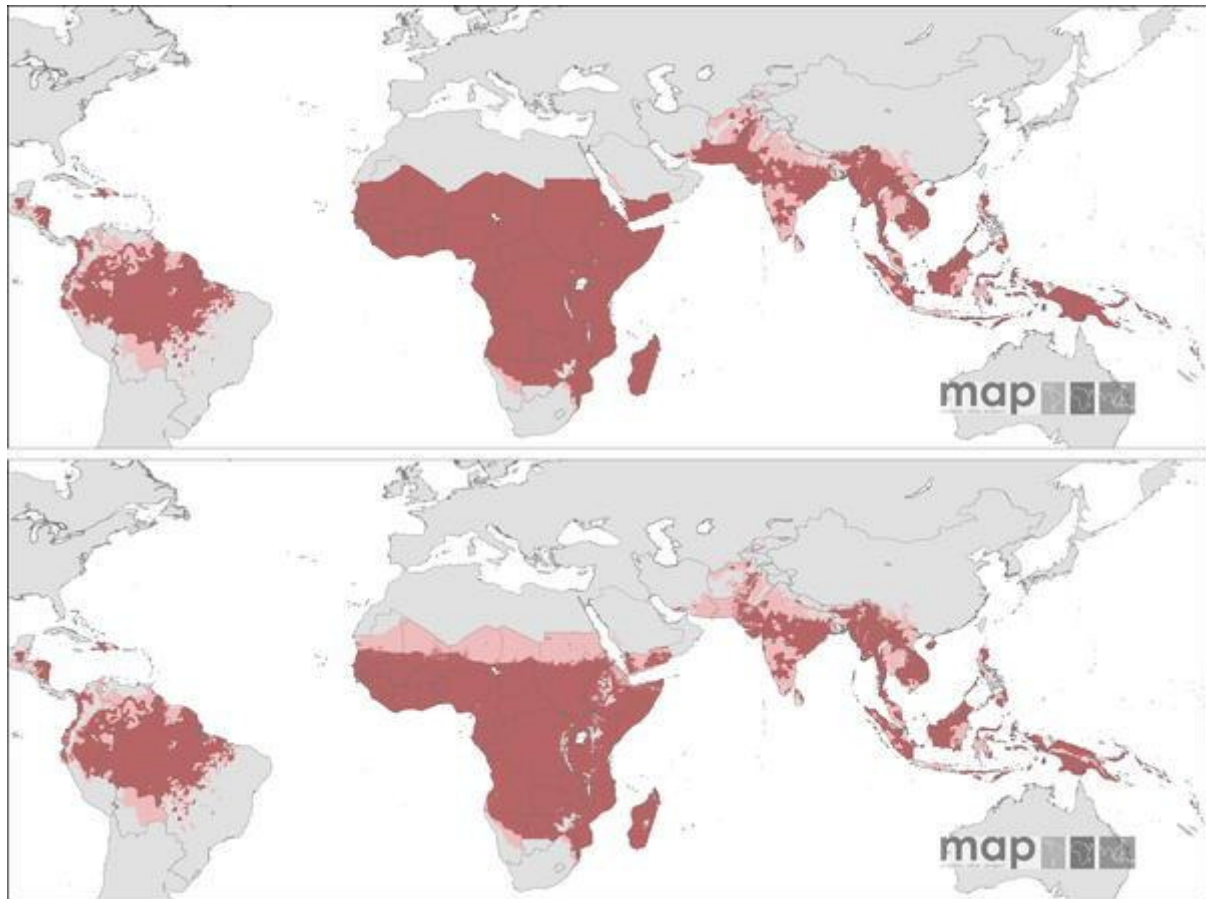


Abbildung 1: Verbreitung von *Plasmodium falciparum*

Quelle: © Carlos Guerra et al., *PLoS Med* 5(2): e38 (2008)

Oben sind die Gebiete farbig markiert, in denen ein hohes Risiko herrscht, wobei dunkelrot durch mehr als 0,1 Fälle pro tausend Menschen und Jahr und hellrot durch weniger als 0,1 Fälle pro tausend Personen und Jahr definiert sind. Grau sind die Areale, in denen keine Ansteckungsgefahr besteht, während Dunkelgrau die Gebiete kennzeichnet, von denen keine Daten vorliegen. Auf der unteren Karte wurden Temperaturverhältnisse und Trockenheit mitberücksichtigt. Dadurch verkleinern sich die Risikogebiete und zeigen ein regional deutlich beschränktes Gebiet.

1.1.2 Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

P. falciparum weist einen komplexen Lebenszyklus auf, bei dem die asexuelle Multiplikation in einem menschlichen Wirt abgelöst wird durch eine obligat sexuelle Vermehrung in einer weiblichen Stechmücke der Gattung *Anopheles* (Talman et al., 2004).

1.1.2.1 Die Entwicklungsschritte in der Mücke

Durch eine Blutmahlzeit der weiblichen *Anopheles* gelangen die weiblichen und männlichen *Plasmodium* Gametozyten in den Mitteldarm der Mücke wo sie sich, initialisiert durch verschiedene auf sie wirkende Reize, zu maturen Gameten weiterentwickeln. Diese Reize sind z.B. ein Abfall der Temperatur und eine Veränderung des pH-Wertes. Dabei kommt es zu einer Exflagellation der männlichen Mikrogametozyten und der Bildung acht beweglicher Mikrogameten (Tewari *et al.*, 2005). Die beiden haploiden Gameten fusionieren zu einer Zygote, die sich weiter zum beweglichen Ookineten differenziert. Der Ookinet penetriert das Epithelium des Mitteldarms und beginnt, nach Erreichen der basalen Seite, sich zu einem sessilen Oozysten zu differenzieren (Matuschewski, 2006). In dem Interzellularraum zwischen Basallamina und dem Epithelium des Mitteldarms folgen zahlreiche Kernteilungen, die jedoch nicht mit Zellteilungen gekoppelt sind. Dadurch entsteht ein vielkerniger Parasit, dessen Größe mit der Zeit zunimmt. Zeitgleich erweitert sich die Oozysten-Plasmamembran innerhalb der Zelle mit Ausbildung von Faltungen, die nach und nach das Zytoplasma unterteilen und auf diese Weise Kompartimente bilden, die Sporoblasten genannt werden (Vlachou *et al.*, 2006). 10-14 Tage nach der Blutmahlzeit werden neu gebildete Sporozoiten in den Interzellularraum aus den Sporoblasten entlassen und gelangen in die Hämolymphe der *Anopheles*-Mücke. Wahrscheinlich werden sie durch den passiven Fluss der Hämolymphe zu der Basallamina der Speicheldrüsen transportiert. Durch bis *dato* unbekannte Rezeptoren sind sie in der Lage an der Membran zu adhären und invadieren die Speicheldrüsen. Durch eine erneute Blutmahlzeit der Mücke werden die Sporozoiten unter die Haut des Säugetiers injiziert und durchdringen das Endothel der Blutgefäße (Sidjanski und Vanderberg, 1997).

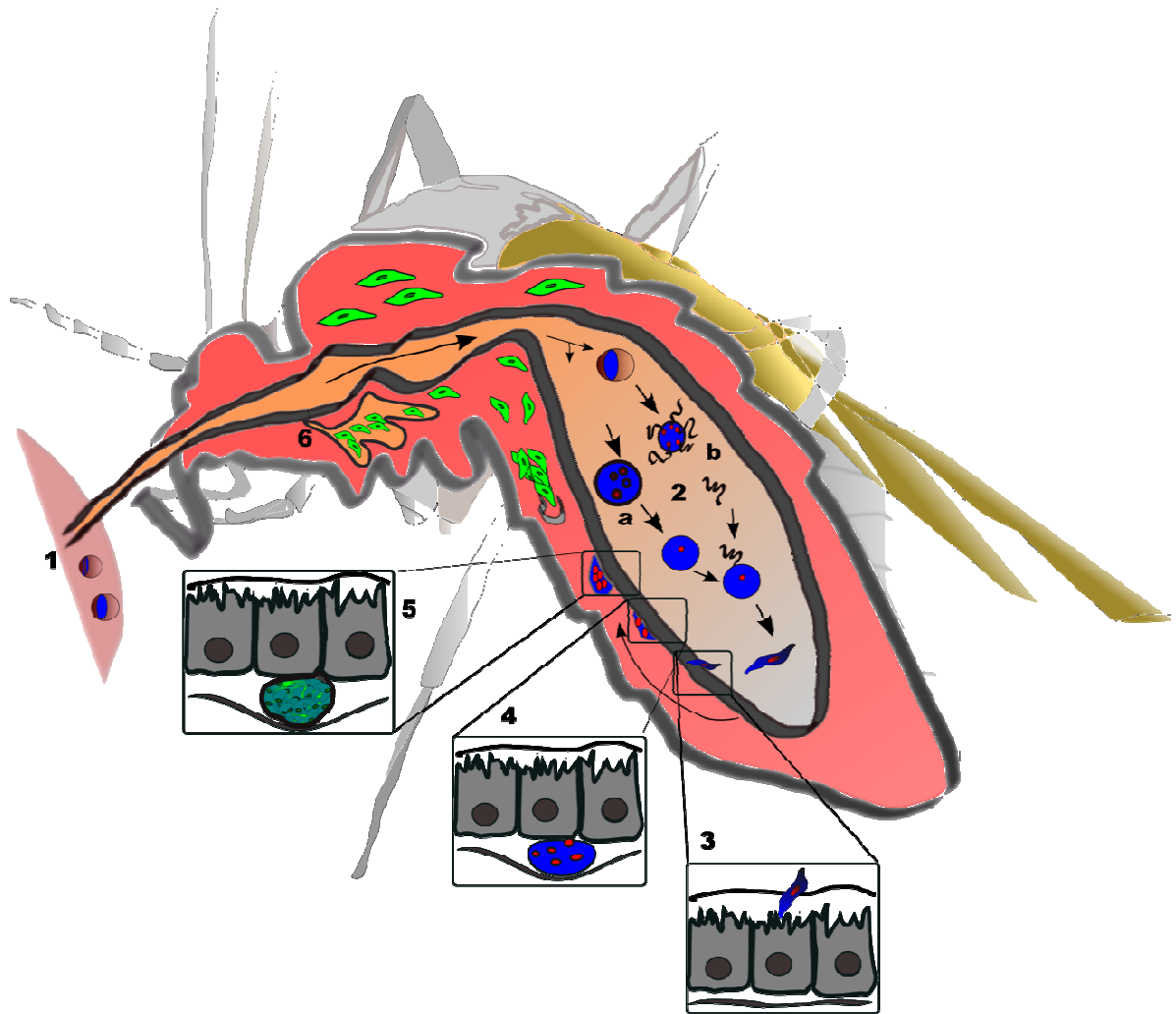


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entwicklungsschritte von *P. falciparum* in der weiblichen Mücke der Gattung *Anopheles* (frei nach Mota M)

1) Weibliche und männliche Gametozyten werden während einer Blutmahlzeit aufgenommen und 2) differenzieren sich im Mitteldarm der Mücke zu a) weiblichen und b) männlichen Gameten, die zu einer Zygote fusionieren, woraus sich ein beweglicher Ookinet entwickelt. 3) Dieser durchwandert das Darmepithelium und bildet auf der basalen Seite einen sessilen Oozyst. 4) Die sich darin entwickelnden Sporoblasten reifen zu 5) Sporozoiten heran, die nach etwa 10-14 d entlassen werden und in die 6) Speicheldrüsen einwandern. Die Sporozoiten werden bei einer neuen Blutmahlzeit in den menschlichen Wirt injiziert.

1.1.2.2 Die Entwicklungsschritte im Menschen

Die initiale Phase einer Malariainfektion wird als die exo-erythrozytäre Phase bezeichnet und beginnt nach der Injektion der Sporozoiten durch die Mücke in die Dermis des Menschen (Amino *et al.*, 2007). Nach kurzer Zeit erreichen die Sporozoiten die Blutbahn, mit deren Strom sie zur Leber transportiert werden (Frevert, 2004). Zwischen den Leberzellen befinden sich die erweiterten Kapillaren

der Leber, sogenannte Lebersinusoide. Diese sind von einem Endothel ausgekleidet und enthalten residente Makrophagen, die als Kupffersche Sternzellen bezeichnet werden (Tardieux und Menard, 2008). Die genauen Mechanismen, wie die Sporozoiten in die Leberparenchymzellen gelangen, konnten bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig geklärt werden. Allerdings gibt es Indizien, die darauf hindeuten, dass die Durchquerung der Kupfferschen Zellen einen obligatorischen Schritt im Lebenszyklus des Parasiten darstellt (Amino *et al.*, 2008). Nach Invasion der Hepatozyten können die Sporozoiten zunächst weitere Leberzellen durchqueren, bevor sie schließlich in einer Zelle ihre weitere Entwicklung vollziehen. Die Invasion in die Wirtszelle ist dabei ein aktiver Vorgang, in dessen Verlauf die, den Parasiten umschließende, parasitophore Vakuole (PV) ausgebildet wird. In dieser Phase des Lebenszyklus kommt es zu einer exo-erythrozythären Schizogonie, währenddessen sich tausende von Merozoiten aus den Sporozoiten bilden. Im Jahr 2006 verfolgte die Gruppe um Heussler die Entwicklung von *Plasmodium berghei*, einer Nagetier-infizierenden Spezies, in einer *in vitro*-Kultur von HepG2-Zellen. Dabei konnten sie erstmals zeigen, dass sich große, mit Merozoiten gefüllte Vesikel von den Leberzellen abschnüren. In diesen, als Merosomen bezeichneten, Membranabschnürungen gelangen die Parasiten wieder in die Lebersinusoide und damit in den Blutkreislauf des menschlichen Wirtes. Hervorzuheben ist dabei, dass bei diesen Membranen offenbar die asymmetrische Verteilung der Phosphatidylserine erhalten blieb, welches Zellen als lebend kennzeichnet und Schutz vor Phagozyten des Immunsystems bietet (Sturm *et al.*, 2006). Nach der Freisetzung der infektiösen Merozoiten in den Blutkreislauf des Vertebraten invadieren diese, unter zeitgleicher Ausbildung einer parasitophoren Vakuole (PV), die roten Blutkörperchen und die Blutstadien-spezifische asexuelle Vermehrung wird eingeleitet (Lingelbach und Joiner, 1998). In diesem Part seines Lebenszyklus durchläuft der Parasit drei, sowohl morphologisch als auch metabolisch divergierende Stadien, die sich auf ein Zeitfenster von etwa 48 Stunden beschränken (Spielmann *et al.*, 2006).

Das erste Entwicklungsstadium, das sogenannte Ringstadium, ist durch eine niedrige metabolische Aktivität sowie geringe Veränderungen von Morphologie und Größe gekennzeichnet (Rojas und Wasserman, 1985). Dieser erste Abschnitt des erythrozytären Stadiums dauert ca. 20 h. Während dieser Zeit sind die Wirtszellen

noch im Blutstrom aufzufinden. Erst etwa 16-20 Stunden nach der Invasion kommt es, aufgrund von Modifikationen auf der Oberfläche des roten Blutkörperchens, zu einer rezeptorvermittelten Zytoadhärenz der Erythrozyten an das Endothel der Blutgefäße (Crabb *et al.*, 1997). Für das nachfolgende Trophozoitenstadium sind eine hohe metabolische Aktivität, Zunahme an Größe sowie die Replikation des Genoms charakteristisch. Als Energie und als Aminosäurequelle dient während dieser Entwicklungsphase das Hämoglobin der Wirtszelle, welches über Phagozytose aufgenommen und durch Cystein- und Aspartatproteasen gespalten wird. Die beim Abbau anfallende, zytotoxische Häm-Gruppe des Moleküls wird in der Nahrungsvakuole des Parasiten zum, für *Plasmodium*-Infektionen, charakteristischen Hämozoin kristallisiert und gespeichert (Francis *et al.*, 1997). Die letzte Phase der intraerythrozytären Entwicklung, das sogenannte Schizonten-Stadium bereitet den Parasiten auf die Invasion neuer Erythrozyten vor. Durch vielfache Replikation des Genoms und einhergehende Kernteilungen bilden sich bis zu 32 Merozoiten, die bei der Ruptur des Erythrozyten in den Blutstrom entlassen werden (Cowman und Crabb, 2006). Nach dem Durchlaufen mehrerer asexueller Generationen, jedoch frühestens 10 Tage nach Auftreten erythrozytärer Stadien (Hackett, 1941), entwickeln sich einige Parasiten zu sexuell differenzierten Gametozyten, weiblichen Makro- und männlichen Mikrogametozyten. Diese können von einer Mücke aufgenommen werden und den Lebenszyklus von *P. falciparum* komplettieren. Die Faktoren, die zu der Bildung von Gametozyten führen, konnten bis heute nicht eindeutig identifiziert werden und scheinen auch innerhalb der verschiedenen Plasmodien-Spezies zu variieren (McKenzie *et al.*, 2007). Sowohl Alter der Patienten, wie auch die Stärke des Fiebers könnten die Gametozytogenese beeinflussen (Gouagna *et al.*, 2004).

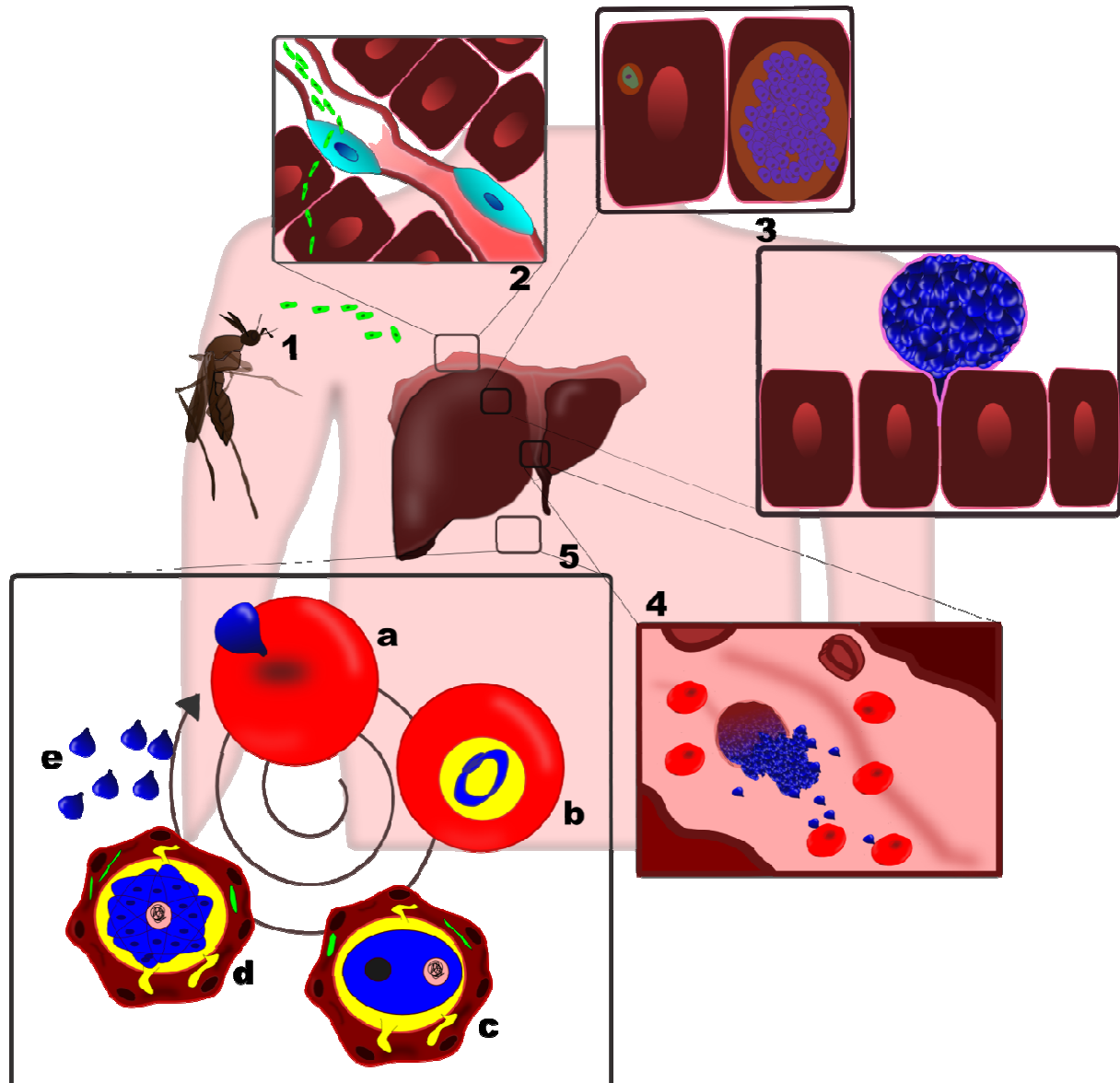


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entwicklungsschritte im Menschen (frei nach Mota M)

1) Nach Injektion der Sporozoiten in die Dermis des Menschen erreichen die Parasiten, 2) mittels Durchwandern residenter Makrophagen 3) die Hepatozyten, die sie unter Ausbildung einer PV invadieren. Die Sporozoiten bilden tausende Merozoiten, die als 3) Merosomen abgeschnürt werden. 4) Die Merozoiten werden in den Blutkreislauf entlassen und 5a) invadieren aktiv, unter gleichzeitiger Ausbildung einer PV, mature Erythrozyten. 5b) Ringstadien entwickeln sich zu metabolisch aktiven 5c) Trophozoiten. Durch den Parasiten induzierte Modifikationen, wie die Ausbildung der Knobs sind auf der Oberfläche der Wirtszelle erkennbar. 5d) Die sich entwickelnden Merozoiten werden durch Ruptur der PV und der Wirtszelle erneut in den 5e) Blutstrom entlassen und können neue rote Blutkörperchen befallen.

1.1.3 Postinvasive Modifikationen der Wirtszelle

Plasmodien sind unter den apikomplexen Parasiten außergewöhnlich in der Wahl ihrer Wirtszelle, da es sich bei maturen Erythrozyten um denukleierte Zellen handelt. Erythrozyten entwickeln sich im Laufe der Erythropoese ausgehend von einer pluripotenten Stammzelle. Dabei ist die Differenzierung besonders durch den Verlust von charakteristischen Zellbestandteilen gekennzeichnet, wie z.B. des Zellkerns und sämtlicher für Proteintransportprozesse benötigte Kompartimente. Rote Blutkörperchen sind metabolisch inaktiv und auch nicht in der Lage, Antigene eines intrazellulären Parasiten in einem MHC Kontext zu präsentieren. Diese Situation bietet dem Parasiten sowohl Vor- als auch Nachteile. Mit der Adhäsion der Erythrozyten an Endothelien ist ein Schutzmechanismus entwickelt worden, der einer Vernichtung durch die Milz vorbeugt. Allerdings ergeben sich durch die Invasion in eine denukleierte Zelle auch mehrere Nachteile. Damit die Entwicklung und damit das Überleben des Parasiten innerhalb des Erythrozyten erfolgreich verläuft, muss *Plasmodium* seine Wirtszelle zunächst modifizieren. Dafür generiert er ein Proteintransportsystem, das über seine Plasmamembran hinaus agiert. Auch in dem Zytoplasma und an der Plasmamembran des Erythrozyten kommt es zu verschiedenen Veränderungen, die nicht nur einen Export von Proteinen erlauben, sondern auch den Import von essentiellen Nährstoffen gewährleisten. Diese überlebensnotwendigen Modifikationen vollziehen sich dabei während der ersten Phase des asexuellen Stadiums (Spielmann *et al.*, 2006).

1.1.3.1 Die parasitophore Vakuole (PV)

Direkt nach der Adhäsion der infektiösen Merozoiten an den Erythrozyten, die vornehmlich durch Proteine aus den Mikronemen herbeigeführt wird (Carruthers und Sibley, 1999), kommt es zu einer Freisetzung der Rhoptrieninhalte. Eine Vielzahl der Rhoptrienproteine scheinen am Aufbau einer parasitophoren Vakuole (PV) involviert zu sein (Kats *et al.*, 2008). Dieses generierte Kompartiment, innerhalb dessen sich der Parasit entwickelt, separiert den Parasiten von dem Zytoplasma der Wirtszelle.

Eine Beteiligung der Rhoprienproteine konnte kürzlich am Beispiel des Rhoprienproteins Rhop2 gezeigt werden. Rhop2 wird während der Invasion zur zytoplasmatischen Seite der PV Membran transportiert (Hiller *et al.*, 2003). Für die Bildung der Membran der PV scheinen zudem auch verschiedene Wirtszellkomponenten inkorporiert zu werden. Dazu zählen unter anderem Sphingolipide, Cholesterin und integrale Membranproteine. Während der Invasion werden diese Proteine, angereichert in sogenannten Detergens-resistenten Membranen (DRM), für die Bildung der parasitophoren Vakuolen Membran (PVM) verwendet (Kats *et al.*, 2008). Dabei scheint die Wahl der Wirtszellproteine selektiv zu sein, da bestimmte DRM residente Proteine wie z.B. Stomatin ausgeschlossen werden (Murphy *et al.*, 2004). Die Herkunft der Lipide, die für die Bildung der PVM benötigt werden, konnte bis *dato* nicht eindeutig geklärt werden (Lingelbach und Joiner, 1998, Mota und Rodriguez, 2002). Indizien sprechen zum Einen für eine *de novo* Synthese, wobei die Lipide wahrscheinlich aus den Inhalten der Rhoprien stammen (Bannister *et al.*, 1986), während andere Versuche mehr auf eine Invagination der Wirtszellmembran hindeuten (Suss-Toby *et al.*, 1996).

Nach erfolgter Invasion und Ausbildung der parasitophoren Vakuole folgen nun eine Vielzahl weiterer Modifikationen, die es dem Parasiten ermöglichen, sich innerhalb seiner Wirtszelle zu entwickeln.

1.1.3.2 Das Tubovesikuläre Netzwerk (TVN) und die Maurerschen Spalten (MC)

Etwa 20-25 Stunden nach der Invasion sind Erweiterungen an der Membranstruktur der parasitophoren Vakuolen erkennbar, die als Tubovesikuläres Netzwerk (TVN) bezeichnet werden und in das Zytoplasma des Erythrozyten hineinragen (Bannister *et al.*, 2000). Es häufen sich die Belege, dass das tubovesikuläre Netzwerk an dem Import von Nährstoffen, Wirtszelllipiden und raft assoziierten Proteinen beteiligt ist (Lauer *et al.*, 2000, Lauer *et al.*, 1997). So scheint eine Blockierung des TVN den Import eines Reporterproteins zu inhibieren, während der Export parasitärer Proteine davon nicht tangiert wurde (Lauer *et al.*, 1997). Für die Assemblierung und die Aufrechterhaltung dieses Netzwerkes gibt es noch keine detaillierten Mechanismen,

jedoch scheint in jedem Fall das Protein Sphingomyelin-Synthase eine essentielle Rolle zu spielen (Elmendorf und Haldar, 1994).

Die sogenannten Maurer's clefts (MC) bzw. Maurersche Spalten stellen eine weitere Struktur innerhalb des infizierten Erythrozyten dar. Benannt wurden sie nach Georg Maurer, der sie Anfang des 20. Jahrhunderts eingehend beschrieben hat. Diese Strukturen sind in dem Wirtszellzytoplasma ab dem späten Ringstadium zu finden (Langreth *et al.*, 1978). Generell erscheinen sie heterogen in ihrer Morphologie, können sowohl in ihrer Größe variieren, sowie in der Lokalisation innerhalb der Wirtszelle. Außerdem ist auch keine definierte Anzahl an MC festzustellen (Wickert und Krohne, 2007). Die Größe und die Gestalt individueller Maurerschen Spalten, lassen sich durch verschiedene äußere Konditionen beeinflussen, so führt z.B. ein dreißig minütiges Absinken der Temperatur auf 20 °C zu einer Vergrößerung der MC. Dieses Phänomen kann auch bei einer pathophysiologischen Veränderung des pH-Werts beobachtet werden, während eine Depletion von Cholesterin keinen Einfluss auf die Morphologie zu haben scheint (Fujioka und Aikawa, 1993, Frankland *et al.*, 2006). Die Herkunft der MC konnte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Verschiedene Forschergruppen postulieren, dass die Spalten zusammen mit dem Tubovesikulären Netzwerk (TVN) in Verbindung stehen und auf diese Weise das Erythrozytenzytoplasma durchziehen (Wickert *et al.*, 2004, Wickert *et al.*, 2003). Versuche mit GFP-gekoppelten Fusionsproteinen deuten jedoch vermehrt darauf hin, dass es sich bei dem TVN und den Maurer's clefts um distinkte Strukturen handelt (Knuepfer *et al.*, 2005a, Wickham *et al.*, 2001). Eine Vielzahl von Parasiten kodierten Proteinen sind als integrale Membranproteine in der Membran der MC verankert, dazu zählen unter anderem die Familie der STEVOR-Varianten (subtelomeric variable open reading frame) (Przyborski *et al.*, 2005), MAHRP1 und SBP1 (Sargeant *et al.*, 2006). Allerdings sind andere Proteine wie z.B. PfEMP1 und KAHRP nur transient mit den Maurerschen Spalten assoziiert und lassen darauf schließen, dass die MC als ein Proteinsortierungskompartiment innerhalb der infizierten Wirtszelle dienen (Spycher *et al.*, 2006).

1.1.3.3 Die Rolle exportierter Proteine in der Pathogenese der Malaria

Die wohl offensichtlichste strukturelle Veränderung des infizierten Erythrozyten ist die Ausbildung elektronendichter Strukturen auf der Oberfläche der Zelle, der sogenannten Knobs. Knobs erscheinen im frühen Trophozoitenstadium auf der Oberfläche der Wirtszelle und die Anzahl steigt stetig während des Maturierungsprozesses des Parasiten. Zudem scheint die Anzahl der Knobs mit der Zahl der Parasiten innerhalb eines Erythrozyten zu korrelieren. Neuere mikroskopische Techniken wie die Atomic force Mikroskopie konnten neue Einblicke in die Feinstruktur der Knobs bringen. Qualitative sowie quantitative Studien infizierter roter Blutkörperchen konnten zeigen, dass diese elektronendichten konischen Strukturen eine Höhe von etwa 22 nm und eine Breite von ca. 83 nm aufweisen (Nagao *et al.*, 2000). Diese Strukturen bestehen vorwiegend aus dem parasitenkodierten Protein KAHRP (knob associated histidine rich protein), welches an der Plasmamembran des Erythrozyten assembliert und mit verschiedenen Komponenten des Zytoskeletts, wie z.B. Spektrin und Aktin interagiert (Pologe und Ravetch, 1986, Rug *et al.*, 2006). Diese Assoziation führt zu einer pathophysiologischen Rigidität der Zelle mit einer einhergehenden Resistenz gegenüber des Blutstroms (Maier *et al.*, 2008). Knobs bieten die Plattform, in welche sich *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) einlagert. PfEMP1 ist verantwortlich für die Adhäsion an endotheliale Zellen, dass die befallene Zelle vor einer phagozytischen Entfernung in der Milz bewahrt. Dieser Prozess kann zudem zu letalen Komplikationen führen, wie z.B. zur zerebralen Malaria, da es auf diese Weise zu Verstopfungen der Blutgefäße und Embolien kommen kann (Crabb *et al.*, 1997, Halder und Mohandas, 2007).

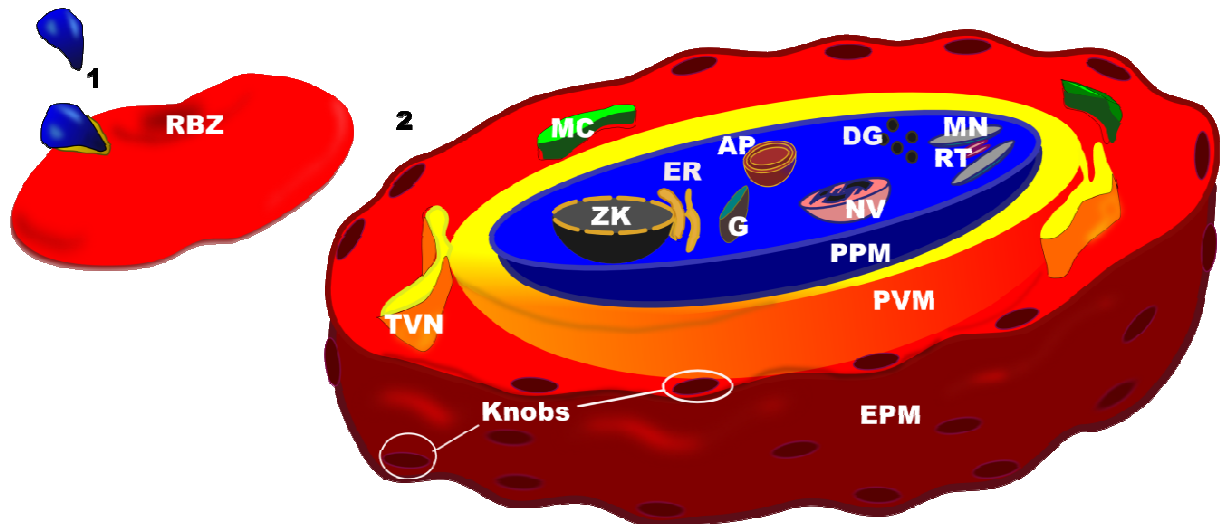


Abbildung 4: Schematischer Querschnitt durch einen infizierten Erythrozyten

1) Während der aktiven Invasion des Merozoiten kommt es zeitgleich zu der Ausbildung einer PV. 2) Während der Entwicklung des Parasiten innerhalb seiner Wirtszelle kommt es zu zahlreichen Modifikationen des Erythrozyten. Abkürzungen: AP, Apikoplast; DG, Dichte Granula; EPM, Erythrozytenplasmamembran; ER, Endoplasmatisches Retikulum; G, Golgi Apparat; MC, Maurersche Spalten; MN, Mikronemen; NV, Nahrungsvakuole; PPM, Parasiten Plasmamembran; PVM, parasitophore Vakuolenmembran; RBZ, Rote Blutzelle; TVN, Tubovesikuläres Netzwerk; ZK, Zellkern

1.2 Transportprozesse

Wie bereits oben beschrieben, werden die pathologischen Modifikationen der Wirtszelle durch verschiedene parasitäre Proteine verursacht, die *P. falciparum* in den Erythrozyt sezerniert. Daher ist ihr Transportweg unmittelbar mit dem sekretorischen Weg innerhalb des Parasiten verbunden. Außerhalb des Parasiten findet wiederum ein gerichteter Weg über die Membran der parasitophoren Vakuole in das Zytoplasma des Erythrozyten statt.

1.2.1 Transport in das Endoplasmatische Retikulum

Die Translokation von Proteinen über eine Membran ist ein fundamentaler Prozess, der sich in allen Reichen der Organismen finden lässt (Doudna und Batey, 2004). Die Notwendigkeit einer Translokation bestimmter Proteine ergibt sich aus der Tatsache, dass diese Proteine in verschiedenen Bereichen innerhalb bzw. außerhalb der Zelle agieren, jedoch zumeist im Zytoplasma der Zelle synthetisiert werden (Tuteja, 2007). Der

gerichtete Transport neu synthetisierter Polypeptide, nach erfolgter Translokation, zu dem jeweiligen Bestimmungsort wird dabei als Proteinsortierung bezeichnet.

Sekretorische Proteine werden in der Regel kotranslational in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert. Dieser Vorgang ist dabei abhängig von sogenannten Signal-Erkennungs-Partikeln (SRP). SRP besteht aus einem multi-Protein-RNA-Komplex, der bei Eukaryoten aus einer etwa 300 Nukleotid langen 7sRNA sowie sechs Protein-Untereinheiten besteht, die nach ihrer Größe in kDA benannt sind als: SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68, sowie SRP72 (Nagai *et al.*, 2003, Keenan *et al.*, 2001). Studien an verschiedenen Organismen konnten zeigen, dass die Assemblierung des SR-Partikels über einen "SRP54-späten Weg" erfolgt, bei welchem alle Komponenten bis auf SRP54 in den Zellkern transportiert und dort an die RNA binden. Dieser Komplex wird daraufhin in das Zytoplasma der Zelle exportiert und erhält durch die Bindung von SRP54 seine vollständige Funktionalität (Pederson, 1999, Alavian *et al.*, 2004).

Bioinformatische Studien konnten zeigen, dass *Plasmodium falciparum* alle Hauptkomponenten eines SRP abhängigen Translokations- und Proteinsortierungsweges aufweist. Jedoch konnten bis jetzt keine Homologen der SRP68/72 Untereinheiten identifiziert werden (Tuteja, 2007). Damit Proteine von den SRP erkannt werden können, benötigen sie eine Signalsequenz, die meist am aminoterminalen Ende lokalisiert ist. Diese ist in ihrer Aminosäurenabfolge variabel, kann jedoch aufgrund ihrer Ladung in der Regel in drei Segmente untergliedert werden. Eine meist positiv geladene n-Region am N-terminalen Ende, gefolgt von einer hydrophoben h-Region, an die sich eine polare c-Region am C-terminalen Ende anschließt. In dem letzten Segment finden sich auch meist kleine ungeladene AS, die die Spaltstelle determinieren (von Heijne, 1985, von Heijne, 1986, von Heijne, 1990). Nach der Bindung des SRP an die Signalsequenz des naszierenden Proteins kommt es als Folge zu einem Elongationsarrest. Der gesamte Komplex, wird zum SRP-Rezeptor geleitet und geht unter GTP-Verbrauch eine Bindung ein, in dessen Verlauf das SR-Partikel freigesetzt wird und neue Polypeptide binden kann (Gilmore *et al.*, 1982). Diese Bindung geleitet das Ribosom zum Translokon, in welches das naszierende Polypeptid nach der Freisetzung kotranslational transloziert wird. Das Translokon setzt sich aus einem Membranproteinkomplex zusammen, bestehend aus TRAM (translocon associated membrane protein) und dem sec61-

Komplex (Stephenson, 2005). Für viele exportierte parasitenkodierte Proteine wie z.B. STEVOR kann *in silico* eine klassische Signalsequenz vorhergesagt werden und auch konnte eine kotranslationale Translokation für z.B. EXP1 (exported protein 1) mit Hilfe von Hunde-Pankreas Mikrosomen nachgewiesen werden (Gunther *et al.*, 1991). In anderen eukaryotischen Organismen erfolgt im Lumen des ER die Abspaltung der Signalsequenz durch einen Signalpeptidase-Komplex, der sich aus mehreren Membranproteinen zusammensetzt (Blobel und Dobberstein, 1975). Und auch im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums von *Plasmodium falciparum* konnte die Existenz einer Signalpeptidase nachgewiesen werden, die funktionell aktiv zu sein scheint (Sharma *et al.*, 2005). Zusätzlich zu den parasitenkodierten Proteinen, die über eine klassische, abspaltbare N-terminale Signalsequenz verfügen, finden sich auch zahlreiche Proteine, die eine, dem aminoterminalen Ende zurückgesetzte hydrophobe Sequenz aufweisen. So lässt sich *in silico* z.B. in der Aminosäurenabfolge von GBP-130 (Glykophorin-bindendes Protein 130) am N-terminalen Ende keine Signalsequenz identifizieren, jedoch verfügt das Protein im Bereich der AS 51-67 über einen internen hydrophoben Bereich, der den Durchtritt in das ER Lumen vermittelt (Cooke *et al.*, 2004).

1.2.2 Der Transport zwischen ER und Golgi-Apparat

Der Transport von Proteinen zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat erfolgt in eukaryotischen Organismen mithilfe von coat-Proteinen (COP), die zu der Donor-Seite der Membran rekrutiert werden und sich anlagern, um dort ein Abschnüren kleiner, mit coat-Proteinen beschichteter, Transport-Vesikel zu verursachen (Stephen *et al.*, 2000). COPII initiiert dabei die Bildung von Vesikeln ausgehend von der ER Membran und führt zu einem anterograden Transport zu der, dem ER zugewandten, sogenannten cis-Seite des Golgi-Apparats. COPI-Vesikel sind hingegen für den Transport vom Golgi-Apparat zum ER und für den retrograden Transport zwischen den ER-Zisternen verantwortlich (Scales *et al.*, 2000).

Generell lässt sich der Golgi-Apparat in drei funktionelle Einheiten unterteilen. Einem cis-Golgi-Netzwerk, eine mediale Einheit und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), welches die Austrittsseite sekretorischer Proteine darstellt (Farquhar und Palade, 1998). Über die morphologischen und funktionellen Charakteristika, sowie den post-

Golgi Transport in *Plasmodium falciparum* ist bisher nur wenig bekannt (van Dooren *et al.*, 2005). Anhand von Studien des cis-Golgi residenten Markerproteins PfERD2, konnte eine perinukleäre Lokalisation gezeigt werden, welches durch elektronenmikroskopische Analysen unterstützt wurde. Dabei stellte sich der Golgi des Parasiten als eine scheibchenförmige Cisterna dar, die morphologisch keine Ähnlichkeit mit dem stapelförmigen Golgi-Apparat höherer Organismen aufweist (Bannister *et al.*, 2000, Elmendorf und Haldar, 1994, Noe *et al.*, 2000). Obschon nur ein Golgi-Kompartiment identifiziert werden konnte, weisen neuere Daten darauf hin, dass sich verschiedene Markerproteine des Golgi-Apparats fraktionieren lassen. Dabei wurde der Pilzmetabolit Brefeldin A (BFA) verwendet. BFA wurde bereits mehrfach angewendet, um den Proteintransport in *P. falciparum* eingehender zu untersuchen (Elmendorf *et al.*, 1993, Wickham *et al.*, 2001). BFA inhibiert den retrograden Transport vom Golgi zum ER, indem ein GDP zu GTP Austausch, der bei dem Abknospungsprozess notwendig ist, stabilisiert wird. Dadurch können sich keine COPI-Vesikel mehr bilden und dieses resultiert in einem Verlust des Golgi-Apparates (Robineau *et al.*, 2000, Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989).

1.2.3 Transport zur parasitophoren Vakuole und über die PVM in die Wirtszelle

Proteine, die in den sekretorischen Weg eintreten und keine weiteren topogenen Sequenzen oder spezifische Prozessierungen aufweisen, die sie in bestimmte Zielkompartimente dirigieren, werden in der Regel von der Zelle löslich sezerniert oder als Membranproteine in die Plasmamembran integriert. Dieser Weg wird allgemein als "Default Pathway" bezeichnet. Hierbei wird ein Vesikel vermittelter Transportweg vermutet. Dabei kommt es zu einer Fusion der Transportvesikel mit der Plasmamembran des Parasiten (PPM) (Denecke *et al.*, 1990). Während dieser Transportweg bei anderen Organismen in der Sekretion spezifischer Proteine an die Umgebung resultiert, werden die parasitären Proteine von *P. falciparum* dagegen in das Lumen der parasitophoren Vakuole transportiert, die als Barriere zwischen dem Parasiten und seiner Wirtszelle liegt. Zusätzliche Transportmechanismen sind somit

Eine Vielzahl parasitenkodierter Proteine wird in das Erythrozytenzytosol bzw. an die Oberfläche der Wirtszelle transportiert. Für den Transport von Proteinen in die Wirtszelle, wurden verschiedene Theorien und Transportmechanismen entwickelt und vorgeschlagen.



23

Während zunächst die Vermutung bestand, dass die Sortierung dieser Proteine innerhalb des Parasiten stattfindet, welches die Theorie des 1-Schritt-Modells stützte (Elmendorf und Haldar, 1993), haben sich mittlerweile die Beweise gemehrt, die ein 2-Schritt-Modell favorisieren (Lingelbach, 1997, Charpian und Przyborski, 2008).

Nach dem 1-Schritt-Modell existieren im Zytoplasma des Parasiten eventuell zwei verschiedene Typen von Vesikeln. Nach der Sortierung werden Proteine, deren finale Lokalisation in der PV ist, in gesonderten Vesikeln transportiert, separiert von den Vesikeln, die die Proteine in die Wirtszelle transportieren. Dabei bestand die Vermutung, dass letztgenannte Vesikel mit Regionen der PPM fusionieren, die in Kontakt mit der Membran der parasitophoren Vakuole stehen und der Inhalt der Vesikel direkt in das Zytosol des Erythrozyten abgegeben wird (Elmendorf und Haldar, 1993). Integrale Membranproteine, wie z.B. EXP1, sollten demnach durch Fusion in die PV gelangen und sich dort durch laterale Diffusion verteilen. Das 2-Schritt-Modell hat eine Sortierung in der PV als Grundlage, die zu der finalen Lokalisation der verschiedenen Proteine führt. Dabei werden die sekretorischen Proteine zunächst durch Fusion von Transportvesikeln mit der parasitären Plasmamembran in die PV entlassen. Dort erfolgt die Sortierung und Proteine, die in bzw. an der Wirtszelle agieren, werden in einem zweiten Schritt über die PVM in den Erythrozyten transportiert (Ansorge *et al.*, 1996, Lingelbach, 1997).

Anfang des Jahres 2008 veröffentlichte die Gruppe von Haldar Forschungsergebnisse, die ein neues Proteinsortierungs-Modell postulierten. Demnach handelt es sich bei den Maurerschen Spalten um ein sekretorisches Organell, in denen die parasitenkodierte sekretorischen Proteine zunächst sortiert und anschließend in das Wirtszellzytoplasma entlassen werden (Bhattacharjee *et al.*, 2008). Belege, die diese Theorie stützen, sind bis jetzt allerdings noch nicht bekannt. Hingegen konnte das 2-Schritt-Modell durch verschiedene experimentelle Ansätze gestärkt werden. Durch den Einsatz von Fusionsproteinen, bestehend aus unterschiedlichen Sequenzen von KAHRP (knob associated histidine rich protein) fusioniert an GFP, konnte gezeigt werden, dass eine Sequenz der ersten 60 aminoterminalen Aminosäuren von KAHRP zu einer Lokalisation dieses Fusionsproteins in der PV führte, während eine Addition drei weiterer Aminosäuren in der Lage war, das Protein über die PVM in das Zytoplasma der Wirtszelle zu transportieren (Wickham *et al.*, 2001). Pulse-chase Experimente mit GBP130 zeigten

indes nicht nur eine transiente Lokalisation des Proteins in der PV, sondern auch eine duale Verteilung dieses Proteins sowohl in der PV als auch in der Wirtszelle (Ansorge *et al.*, 1996).

1.2.5 Voraussetzungen für einen Transport in die Wirtszelle

Eine Frage, die es in diesem Zusammenhang noch im Detail zu klären gilt, ist wie Proteine über die PVM in die Zytosol der Wirtszelle kommen.

Im Jahr 2004 gelang zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Identifizierung eines essentiellen pentameren AS-Motivs (RxLxE/Q/D), welches als PEXEL (*Plasmodium* export element) bzw. HT-Signal (host targeting) bezeichnet wurde (Marti *et al.*, 2004, Hiller *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass dieses Motiv für die Translokation von löslichen, wie auch Membranproteinen über die PVM verantwortlich ist. Dieses Motiv ist dabei meist im ersten Exon in einem Zwei-Exon Gen kodiert (Przyborski und Lanzer, 2004) und besteht aus drei konservierten Aminosäuren an den Positionen 1, 3 und 5. Die AS an den Positionen 2 und 4 können variieren, ihnen gemeinsam ist jedoch, dass sie ungeladen sein müssen. Die Relevanz der konservierten Aminosäuren konnte mittels gerichteter Mutagenese bewiesen werden. Dabei wurden die essentiellen AS je durch Alanine ersetzt und führten als Konsequenz zu einem Arrest dieser Proteine in der PV. Auch scheinen die flankierenden Bereiche eine wesentliche Rolle zu spielen, da Studien mit Fusionsproteinen erst eine erfolgreiche Translokation zeigten, nachdem zwischen dem pentameren Motiv und dem nachfolgenden Reporterprotein eine räumliche Trennung durch wenigstens 10 AS erfolgte (Knuepfer *et al.*, 2005b). An dieser Stelle muss jedoch auch darauf hingewiesen werden, dass eine Vielzahl parasitenkodierter exportierter Proteine kein PEXEL/HT-Motiv aufweisen. Dazu zählen unter anderem die in dem Ringstadium transkribierten Proteine SBP1 (Skeleton-binding protein 1) und MAHRP1 (Membrane-associated protein 1), die vermutlich über einen PEXEL/HT-unabhängigen Transportweg in die Wirtszelle geleitet werden (Spielmann *et al.*, 2006).

Ein weiterer Aspekt, der ein 2-Schritt Modell erklären könnte, und damit von einer Sortierung der Proteine in der parasitophoren Vakuole ausgeht, ist das Analyseergebnis einer extensiven Proteomanalyse der PV. Diese konnte einen

hohen Anteil an Chaperonen identifizieren, die an der Proteinsortierung und Translokation beteiligt sein könnten (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006).

Eine weitere Frage, die sich in diesem Zusammenhang ergibt, betrifft den Ort der Erkennung des PEXEL/HT-Motivs. Es wurde postuliert, dass das Motiv Gültigkeit für lösliche, als auch Membranproteine hat. Der Transport von Membranproteinen, der wahrscheinlich durch Vesikel und Fusionsprozesse von Membranen vonstatten geht, divergiert in nicht unwesentlicher Weise von dem Transportmechanismus löslicher Proteine, bei denen eine Translokation über die PVM in löslicher Weise wahrscheinlich ist (Lingelbach und Przyborski, 2006).

Geht man davon aus, dass das PEXEL/HT-Signal erst in der PV erkannt und daraufhin eine Sortierung der Proteine erfolgt, bleibt ungeklärt, wie Membranproteine, deren Motive in einem Vesikel vorliegen und somit nicht erkannt werden können, dennoch sortiert werden. Eine weitere Theorie besagt, das PEXEL/HT bereits im ER als Sortierungssignal erkannt wird und die Proteine dementsprechend sortiert werden. Da sowohl lösliche, als auch Membranproteine über das ER in den sekretorischen Weg gelangen, wäre eine Erkennung des Motivs somit gesichert (Lingelbach und Przyborski, 2006). Eine Studie, die erste Hinweise auf die Erkennung und Funktion dieses Signals gibt, wurde von Marletta und Kollegen veröffentlicht. Mithilfe von Edman-Abbau und MALDI-TOF Analysen konnte sowohl für PfHRP11, sowie PfEMP2 gezeigt werden, dass die Erkennung des PEXEL/HT-Motivs im ER stattfindet. Dabei stellte sich heraus, dass beide Proteine an der PEXEL/HT-Sequenz nach der dritten Aminosäure (RL/IL↓H/SE) gespalten und an der vierten Position in Folge N-Acetyliert werden (Chang *et al.*, 2008). Versuche mit Brefeldin A untermauerten dabei, dass diese N-terminale Prozessierung im ER erfolgt. Ausgehend von diesen Ergebnissen postulieren die Autoren, dass das Motiv eine neuartige ER-Peptidase-Spaltstelle darstellt. Neuere Daten einer anderen Arbeitsgruppe belegen diese Hypothese zu einem gewissen Anteil. Durch subzelluläre Zellfraktionierungen konnten sie zeigen, dass eine N-terminale Prozessierung am Leucin innerhalb des PEXEL/HT-Motivs erfolgt und damit die zuvor veröffentlichten Daten bestätigen. Allerdings konnten sie durch Mutagenesestudien zeigen, dass eine N-Acetylierung auch erfolgt, wenn innerhalb des Motivs ein Austausch der Glutaminsäure mit Alanin erfolgte. Diese Mutation resultierte, trotz N-Acetylierung in einer Akkumulation des Proteins in der PV und

scheint damit keine Auswirkung auf eine erfolgreiche Translokation zu haben (Boddey *et al.*, 2008).

Für das lösliche parasitäre Protein GBP130, dessen Ziel-Lokalisation das Zytosol der Wirtszelle ist, konnte gezeigt werden, dass dieses temporär in der parasitophoren Vakuole zu finden ist, bevor es in das Zytoplasma transloziert wird (Ansorge *et al.*, 1996). Die Translokation könnte zum Einen durch einen Mechanismus vollzogen werden, der Transportvesikel beinhaltet. Dabei könnten Vesikel involviert sein, die von der PVM abknospen und zu den MC und bzw. oder der Erythrozytenmembran geleitet werden. Wahrscheinlich, im speziellen für lösliche Proteine, wäre auch ein Translokon-basierter Prozess (Spycher *et al.*, 2006, Lingelbach und Przyborski, 2006). Bis *dato* konnten in der parasitophoren Vakuole keine homologen Proteine zu der sec61 Translokon Maschinerie detektiert werden und auch für diesen Translokon typische Enzyme wie z.B. sec63 oder PfBiP konnten nicht identifiziert werden (Botha *et al.*, 2007). Botha und Kollegen vermuten einen Translokations-Mechanismus, bei dem PV residente HSP70-Proteine die Translokation der zu exportierenden Proteine über einen noch nicht identifizierten Translokator vermitteln. Auf der Trans-Seite vermuten sie, dass PfHSP40-Proteine die translozierten Proteine empfangen und dort an Wirtszell-HSP70s weitergeben, die die korrekte Faltung und eventuelle Assemblierungs-Prozesse unterstützen (Botha *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welche Art von Translokator in der PVM vorliegt und in welchem Zustand sich die zu translozierenden Proteine befinden müssen, damit eine erfolgreiche posttranslationale Translokation stattfinden kann.

1.2.6 Generelle Translokationsmechanismen

Bis auf wenige Ausnahmen müssen Proteine für eine posttranslationale Translokation in einen translokationskompetenten Zustand gebracht werden oder vollständig entfaltet sein. Dieses kann unter anderem für den Import in Mitochondrien wie auch Chloroplasten beobachtet werden. Bei dem mitochondrialen Proteinimport werden Preproteine zunächst an freien Ribosomen synthetisiert. Diese werden von Rezeptoren auf der Oberfläche der Mitochondrien erkannt und anschließend posttranslational durch den Translokasekomplex der äußeren Membran (TOM = Translocase of the outer membrane) importiert, wobei sie anschließend in eines der

mitochondrialen Kompartimente sortiert werden (Schatz und Dobberstein, 1996, Rapaport *et al.*, 1997, Kunkle *et al.*, 1998). Für diesen Transport ist die Entfaltung und Faltung der Proteine essentiell, an der sowohl zytosolische, als auch mitochondriale Chaperone beteiligt sind. Auch bei dem Import in den Chloroplasten handelt es sich um einen posttranslationalen Prozess, bei dem die Vorläuferproteine auf energieabhängige Weise in das Organell transloziert werden. Diese Translokation wird dabei durch Multiproteinkomplexe vermittelt, die sich in der äußeren und inneren Hüllmembran befinden und als TOC (Translocon at the outer envelope of the chloroplast) bzw. TIC (Translocon at the inner envelope of the chloroplast) bezeichnet werden (Soll und Schleiff, 2004, Kessler und Schnell, 2006). Ähnlich wie bei dem mitochondrialen Import, werden auch hier zytosolische Faktoren, wie molekulare Chaperone vermutet, die das Preprotein in einen Import-kompetenten, entfalteten Zustand bringen (Jarvis, 2008).

Eine Ausnahme von der Regel stellt z.B. das bakterielle Tat-Translokationssystem dar. Dieser Twin-Arginin Transportweg ist für eine Membrantranslokation vollständig gefalteter Proteine zuständig und konnte bereits in Bakterien, Archaeen, sowie in den Thylakoidmembranen von Pflanzen identifiziert werden (Sargent, 2007). Die von diesem Transporter translozierten Proteine können dabei auch in einer oligomerisierten Form vorliegen, bei der nur einige Untereinheiten ein TAT-Motiv aufweisen (Rodrigue *et al.*, 1999). Ein weiteres Beispiel für eine Translokation oligomerisierter gefalteter Proteine ist bei dem Import in Peroxisomen zu finden. Sämtliche peroxisomale Proteine sind im Kern der Zelle kodiert und werden an freien Ribosomen synthetisiert. Danach erfolgt der Import in die Peroxisomen der bereits gefalteten Proteine, der durch die peroxisomale Target-Sequenzen (PTS) vermittelt wird. Dabei kann der Proteinimport in vier Schritte unterteilt werden. Zunächst kommt es zu einer Rezeptor-Kargo-Interaktion, was zu einer Bindung an den Docking-Komplex der peroxisomalen Membran führt. Nach der Translokation kommt es zu einer Freisetzung des Proteins und der Rezeptor kehrt in das Zytoplasma der Zelle zurück und kann neue Proteine binden (Brown und Baker, 2008). Auch findet bei den meisten dieser Proteine keine Abspaltung der Signalsequenz statt (McNew und Goodman, 1994, Walton, 1996). Die vorgestellten Beispiele sind Mechanismen der ungewöhnlichen Translokation. Bei einer Vielzahl von Translokationen müssen sich jedoch Proteine für eine erfolgreiche Translokation in einem

translokationskompetenten Stadium befinden. Dafür werden in der Regel auf beiden Seiten der Membran Chaperone benötigt, die eine Translokation ermöglichen.

Die Identifizierung verschiedener Chaperone in der PV, die an einem Translokations-Prozess beteiligt sein könnten, unterstützt die Vermutung in Bezug auf einen existenten Translokator in der PVM (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006). Auch konnten Translokationsstudien mit GBP130 zeigen, dass für den Export Energie in Form von ATP notwendig ist (Ansorge *et al.*, 1996). Die Beteiligung ATP-verbrauchender Prozesse unterstützt die Theorie, dass Chaperone, wie z.B. HSP70 bei der Translokation involviert sind.

1.3 Die Verwendung der Dihydrofolat Reduktase bei Proteinfaltungs-Analysen

Die Dihydrofolat Reduktase (DHFR) katalysiert in NAPH-abhängiger Weise die Bildung von Tetrahydrofolat aus Dihydrofolat. Dieses Enzym spielt unter anderem eine essentielle Rolle bei der Purinsynthese, aber auch bei der Synthese der Aminosäuren Glycin und Methionin (Hartman, 1993). Die Aktivität von DHFR kann unter anderem durch die Folat-Analoga Methothrexat und Aminopterin inhibiert werden, die kompetitiv an das aktive Zentrum dieses Enzyms binden.

In experimentellen Systemen kann DHFR verwendet werden um Proteinfaltungen zu untersuchen, da durch die Bindung eines Folat-Analogs das DHFR in seiner gefalteten Konformation stabilisiert wird. Dieser Zustand ist dabei so stabil, dass auch Chaperone nicht in der Lage sind, diese Faltung aufzulösen. Zudem wird aufgrund dieser Bindung eine Protease-Resistenz vermittelt (Eilers und Schatz, 1986, Salvador *et al.*, 2000).

Durch die Fusion von DHFR an z.B. Signalsequenzen kann das Protein verwendet werden, um den Effekt einer Faltung in Transport- und Translokationssystemen zu untersuchen. Dabei ist als weiterer Vorteil zu sehen, dass dieses System auch *in vivo* angewendet werden kann, da die Folat-Analoga wie z.B. Aminopterin (AP) membrangängig sind und die Effekte einer Faltungsstabilisierung so in den verschiedensten Kompartimenten studiert werden können. Der Einfluss einer stabilisierten Proteinfaltung in Bezug auf den Proteintransport über die PVM ist in Abb. 6 schematisch dargestellt.

1. Einleitung

Dieses System konnte bereits in verschiedenen Organismen etabliert werden und zu der Aufklärung unterschiedlicher Transportvorgänge beitragen (Rassow *et al.*, 1989, Eilers und Schatz, 1986, Hausler *et al.*, 1996, Wienhues *et al.*, 1991).

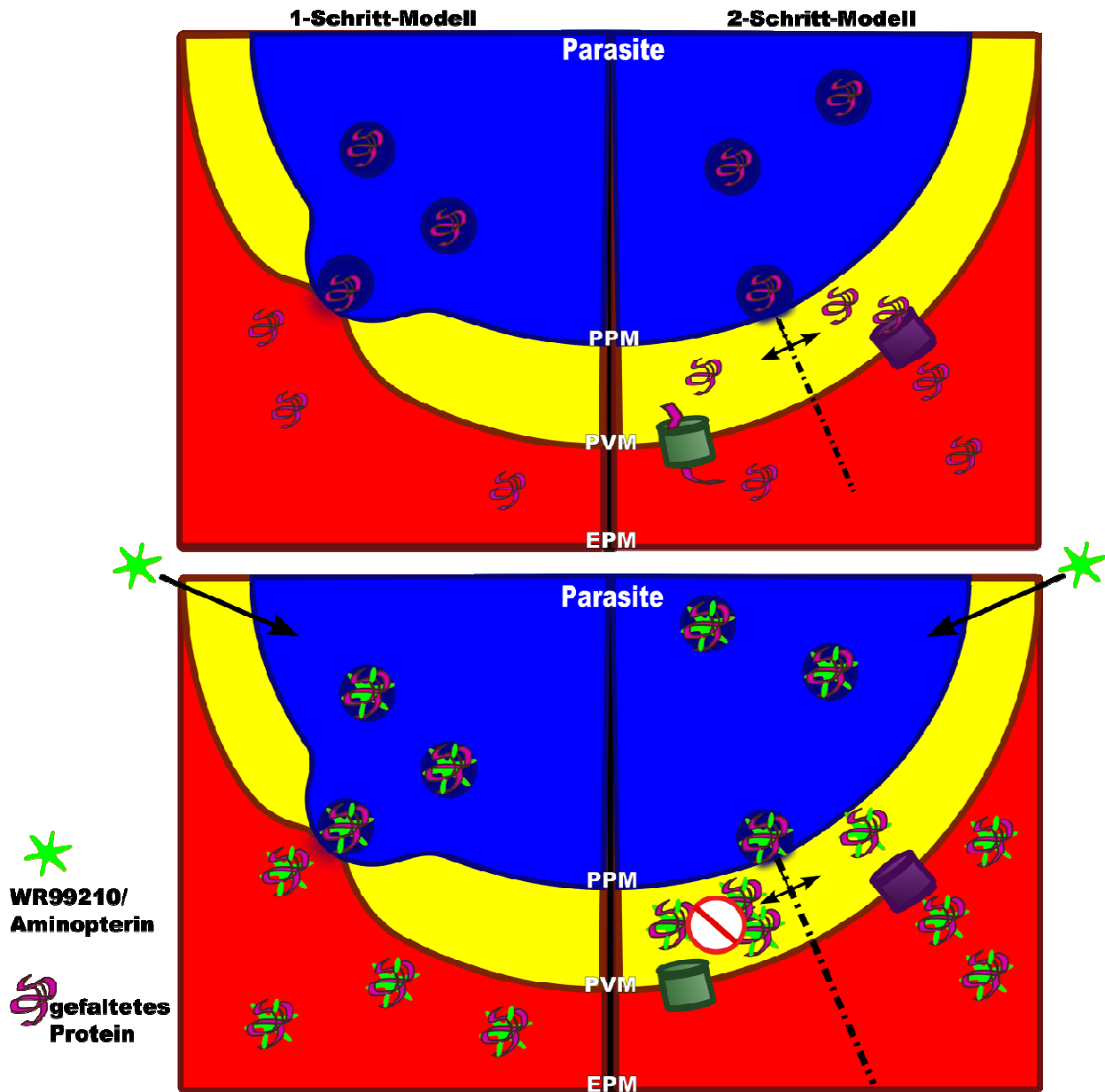


Abbildung 6: Möglicher Einfluss der Faltung auf den Export parasitenkodierter Proteine in das Zytoplasma der Wirtszelle

Die linke Seite repräsentiert das 1-Schritt-Modell, nach dem Proteine durch Vesikelfusion direkt in das Zytoplasma der RBZ entlassen werden. Werden diese in ihrer gefalteten Konformation stabilisiert (links unten), sollte das keinen Einfluss auf den Weitertransport haben. Demgegenüber stellt die rechte Spalte das 2-Schritt Modell dar. Hier sind zwei Alternativen vorstellbar. Falls die Proteine für eine Translokation in eine translokationskompetente Konformation gebracht werden müssen, könnte eine Stabilisierung des Proteins in seiner gefalteten Konformation den Weitertransport inhibieren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Translokator Proteine in seiner muren Form translozieren kann. Dabei wäre zu erwarten, dass diese Proteine im Erythrozytenzytosol zu detektieren wären.

1.4 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit

Der Fortschritt in den molekularbiologischen Manipulationsmöglichkeiten, der Einsatz von Reporterproteinen, sowie proteinbiochemische Analysemethoden haben zu einer immer detaillierteren Aufklärung der Transportvorgänge in dem Erreger der Malaria tropica, *Plasmodium falciparum* geführt.

Noch ungeklärt ist, wie Proteine über die PVM in das Zytoplasma der Wirtszelle transportiert werden. Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die 2-Schritt Hypothese, nach der lösliche Proteine zunächst in das Lumen der PV entlassen werden, bevor sie in das Zytoplasma der Wirtszelle transportiert werden. Insbesondere soll überprüft werden, ob Proteine für eine erfolgreiche Translokation in einen translokationskompetenten entfalteten oder teil entfalteten Zustand gebracht werden müssen, oder ob diese Proteine in ihrer Tertiärstruktur über die PVM exportiert werden können.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein System zu etablieren, welches eine induzierbare stabile Faltung eines löslichen Fusionsproteins ermöglicht. Im Anschluss soll dieses System eingesetzt werden, um festzustellen, ob eine Faltung den Translokationsprozess dieses Proteins beeinflussen kann. Diese Arbeit soll einen Aufschluss darüber geben, welche Art von Exportprozess über die PVM vorliegt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Produktbezeichnung	Hersteller	Ort
Agarosegelkammern	Gibco BRL	Neu-Isenburg
Airfuge Ultrazentrifuge	Beckman	Irvine USA
Blotting Apparatur	Phase	Lübeck
Brutschrank	Heraeus	Hanau
Digitale Kamera, EDAAS 120	Kodak	
Dri Block Heaters DB-2A	Techne Inc.	Burlington USA
Feinwaage 2414	Sartorius Göttingen	Göttingen
Geltrockner	Biotec Fischer	Schwerte
Gene-Pulser Elektroporator	BioRAD	Hercules, USA
Kühlzentrifuge Mikro 22R	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
Laborroller Spiramax5	Denley	UK
Laminar Air Flow-Gelaire-Class 100	Gelman	Mailand, I
Macintosh Power PC 7500/100	Apple Macintosh	Cupertino, USA
Magnetrührer Combimag RCH	IKA	Staufen
Personal Cycler	Biometra	Göttingen
pH-Meter 766	Calimatic	Mering
Power Supply 2103	LKB Biochrom	St. Albans, UK
SAE 2761 Power Supply	Shandon	Pittsburgh, USA
Schüttler-Vibrax VXR	IKA	Staufen
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Co., Inc.	USA
Spectrophotometer DU7	Beckman	Irvine, USA
Spectrophotometer Biowave S2100	Biochrom Ltd	Cambridge, UK
Superspeed Refrigerated Centrifuge	DuPont Instr. Sorvall	Bad Homburg

2. Material und Methoden

Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super 10 P	Kobe	Marburg
Vortexer REAX 2000	Heidolph	Schwabach
Waage P1200	Mettler	Gießen
Waage 1205 MP	Sartorius	Göttingen
Wärmewasserbad	Köttermann	Uetze/Hänigsen
Wippschüttler Duomax 1030	Heidolph	Schwabach

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Glaswaren

Produktbezeichnung	Hersteller	Ort
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg
Erlenmeyerkolben	Kobe	Marburg
Elektroporations-Küvette	BioRAD	Hercules, USA
Expositionskassetten	rego	Augsburg
Falconröhrchen	Greiner	Frickenhausen
Filme New RX NIF	New RX NIF, Fuji	Japan
Filterpipettenspitzen	Abimed	Langenfeld
Gel Loader Tips	Eppendorf	Hamburg
Glasobjektträger	IDL	Nidderau
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell	Dassel
Pasteurpipetten	COPAN	Italien
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf	Hamburg
Pipetten	Gilson	Villiers-le-Bel, F
Pipettenspitzen	Greiner	Frickenhausen
Plastikpetrischalen	Greiner	Frickenhausen
Plastikpipetten	Greiner	Frickenhausen
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell	Dassel
Zentrifugen Tube	Beckman	Irvine, USA

2.1.3 Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller	Ort
Agar	Roth	Karlsruhe
Agarose NEEO	Roth	Karlsruhe
Aminobenzoessäure (Free acid)	Sigma	Taufkirchen
Ammoniumbicarbonat (NH_4HCO_3)	Sigma	Taufkirchen
Ammoniumnitrat	Sigma	Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth	Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth	Karlsruhe
Ampicillin (Amp)	Roth	Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Biomol	Hamburg
Borsäure (H_3BO_3)	Roth	Karlsruhe
Brefeldin A	Fluka	Neu-Ulm
Bovines Serum Albumin Frakt. V (BSA)	Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl_2)	Roth	Karlsruhe
Casaminoacids	Sigma	Taufkirchen
Carboxin	Sigma	Taufkirchen
Chloroform	Merck	Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka	Neu-Ulm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka	Neu-Ulm
1,4-dithio-DL-threitol (DTT)	Fluka	Neu-Ulm
Eisen(III)chlorid	Roth	Karlsruhe
Ethanol p.a. (EtOH)	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma	Taufkirchen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva	Heidelberg
Glukose	Merck	Darmstadt
Glycerin	Roth	Karlsruhe
Glycin	Roth	Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth	Karlsruhe
Heparin	Sigma	Taufkirchen
Hepes	Applichem	Darmstadt
Hydrochinon	Sigma	Taufkirchen

2. Material und Methoden

Isopropanol	Roth	Karlsruhe
Kaliumbromid	Sigma	Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe
Kaliumnitrat (KNO ₃)	Roth	Karlsruhe
Kupfersulfat	Roth	Karlsruhe
Luminol	Roth	Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth	Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Sigma	Taufkirchen
Methanol (MeOH)	Merck	Darmstadt
Natriumcarbonat	Roth	Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth	Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth	Karlsruhe
Natriumethylmercurithiosalicylat (TMS)	Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck	Darmstadt
Natriumsulfat	Sigma	Taufkirchen
Natriumsulfit	Sigma	Taufkirchen
Nitrobluetetrazoliumchlorid (NBT)	Biomol	Hamburg
NNN`N-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Fluka	Neu-Ulm
Nutrient-Broth	Roth	Karlsruhe
PEG 4000	Sigma	Taufkirchen
Pepton	Roth	Karlsruhe
Phenol	Roth	Karlsruhe
Ponceaurot S Pure	Serva	Heidelberg
Protogel (30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid)	National Diagnostics	Atlanta, USA
Saccharose	Roth	Karlsruhe
Salzsäure (HCL)	Roth	Karlsruhe
Sorbitol	Sigma	Taufkirchen
Thiamin (Hydrochlorid)	Sigma	Taufkirchen
Trichloressigsäure	Roth	Karlsruhe
Trishydroxymethyaminomethan (Tris)	Roth	Karlsruhe
Triton [®] X-100	Sigma	Taufkirchen
Trypsin	Sigma	Taufkirchen
Tween [®] 20	Roth	Karlsruhe

2. Material und Methoden

Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Fluka	Neu-Ulm
---	-------	---------

2.1.4 Antikörper und Seren

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Ort/Referenz
Maus anti-GFP	1:1000	Roche Diagnostics	Mannheim
Ziege anti-Maus AP	1:2000	DAKO	Glostrup
Huhn anti-Maus HRP	1:2000	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
Kaninchen anti-PfGBP	1:500	Eigene Arbeitsgruppe	Ansorge <i>et al.</i> , 1996
Kaninchen anti-PfSERP	1:500	Eigene Arbeitsgruppe	Knapp <i>et al.</i> , 1989
Kaninchen anti-PfAldolase	1:5000	Eigene Arbeitsgruppe	Knapp <i>et al.</i> , 1990
Maus anti-PfHSP70	1:1000	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
Kaninchen anti-GFP	1:1000	Santa Cruz	Santa Cruz, USA
Kaninchen anti-PfPV1	1:1000	Eigene Arbeitsgruppe	Nyalwidhe J

2.1.5 Enzyme

Produktbezeichnung	Hersteller	Ort
Alkalische Phosphatase, calf (CIP)	Roche Diagnostics	Mannheim
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes	Espoo, Finnland
<i>BssHII</i>	New England Biolabs	Schwalbach
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen	Groningen
<i>Taq</i> Polymerase	Frank Seeber	Berlin
T4 Polynucleotid Kinase (cloned)	usb Corporation	Ohio, USA
T4-DNA Ligase	Invitrogen	Groningen
KOD Polymerase	Novagen	
<i>AvrII</i>	New England Biolabs	Schwalbach
<i>KpnI</i>	New England Biolabs	Schwalbach
<i>XmaI</i>	New England Biolabs	Schwalbach
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Calbiochem	Darmstadt

2.1.6 Plasmide

Plasmid	Resistenzen	Kommentar	Referenz
FGF2-GFP-DHFR	Doxycyclin	FGF2	Backhaus <i>et al.</i> , 2004
pARL2+	Ampicillin, WR99210		Przyborski <i>et al.</i> , 2005
pARL ^{DG}	WR99210	DHFR und GFP	Eigene Arbeit
pARL ^{GDG}	Ampicillin, WR99210	150 AS N-terminal von GBP130 vor DHFR und GFP	Eigene Arbeit
pARL-GFP	Ampicillin, WR99210	GFP	Backhaus <i>et al.</i> , 2004
pARL2-GFP	Ampicillin, WR99210	GFP	Eigene Arbeit
pARL ^{SDG}	Ampicillin, WR99210	80 AS N-terminal von STEVOR, DHFR und GFP	Eigene Arbeit

2.1.7 Oligonukleotide

Alle hier aufgeführten Primer wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg bezogen. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

Name	Enzym	Sequenz (5'-3')
GFP-K-F	<i>KpnI</i>	GTAC <u>CGGTACCAT</u> GAGTAAAGGAGAAGAAC
GFP-X-R	<i>XmaI</i>	GATC <u>CCCCGGG</u> TATTTGTATAGTTCATCC
DHFR-X-A-F	<i>XhoI</i> , <i>AvrII</i>	CCGCTCGAGCCTAGGATGGTTCGACCATT
DHFR-K-R	<i>KpnI</i>	GGG <u>GTACCGT</u> CTTTCTTCTCGTAGACTTC
stev-X-F	<i>XhoI</i>	<u>CTCGAGATGAAGATGTATAACC</u>
stev1-80-B-A-R	<i>BssHII</i> , <i>AvrII</i>	GGCCTAGGGCGCGC <u>TTTCTTTATTGCGTCTTCG</u>
GBP-Xho-F	<i>XhoI</i>	GGCTCGAGATGCGACTTTCTAAAGTATCTG
GBP150-B-R	<i>BssHII</i>	GGGCGCGC <u>TTGCTTTTTTACTACTTTTTTGGT</u>
pARL-F		CGTTAATAATAAATACACGCAG

2. Material und Methoden

pARL-R		CAGTTATAAATACAATCAATTGG
--------	--	-------------------------

2.1.8 Molekularbiologische Kits und Reagenzien

Produktbezeichnung	Hersteller	Ort
Gelextraktions-Kit	Seqlab	Göttingen
MinElute Reaction Cleanup Kit	QIAGEN	Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN	Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN	Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN	Hilden
TRIzol Reagent	Invitrogen	Groningen

2.1.9 Größenmarker und Ladepuffer

Produktbezeichnung	Hersteller	Ort
1kb+ DNA ladder	Invitrogen	Groningen
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot
PageRuler Unstained Protein Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot

2.1.10 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Lösung	30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) Bisacrylamid
Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer)	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Ammoniumpersulfat	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat in A. dest.
Ampicillin	Ampicillin 50 mg/ml in H ₂ O
Auftragspuffer für DNA (5x)	1% Bromphenolblau 30% (w/w) Glycerol 50 mM Tris-HCl, pH 8 5 mM EDTA

2. Material und Methoden

	A. dest.
BCIP-Stocklösung	5% BCIP in 100 % Dimethylformamid
Blocklösung	5% (w/v) Milchpulver in PBS ⁺⁺ pH7,4 0,01% TMS
Colloidal Coomassie Färbelösung	0,08 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB G250) 1,6 % (v/v) ortho-Phosphorsäure 8 % (w/v) Ammoniumsulfat 20 % (v/v) Methanol
Enhanced Chemoluminescence Lösung (ECL)	50 mM Luminol in DMSO 0,8 mM p-Coumarsäure in DMSO 200 mM Tris-HCl, pH 8,8 dann 0.01 % H ₂ O ₂ in ddH ₂ O zugeben
Entwickler D-19b	0,22% Metol 0,88% Hydrochinon 7,2% Natriumsulfit 4,8% Natriumcarbonat 0,4% Kaliumbromid
Laemmli-Gelelektrophoresepuffer	2,5 mM Tris-HCl 19,2 mM Glycin 0,01 % (w/v) SDS in entionisiertem H ₂ O
NBT-Stocklösung	5% NBT in 70% Dimethylformamid
Phosphat Buffer Saline (PBS) pH 7,4	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄
Ponceau S-Färbelösung	0,2% Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure
Probenpuffer für SDS-PAGE, reduzierend	100 mM Tris-HCl pH6,8 20% Glycerin 0, 2% Bromphenolblau 5 mM EDTA 100 mM DTT
Sammelgelpuffer (4x) für SDS- PAGE (pH 6,8)	0.5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % SDS
Semi-Dry-Blotpuffer	48 mM Tris-HCl 39 mM Glycin 0,0375 % SDS

2. Material und Methoden

TAE-Puffer (10x)	890 mM Tris 890 mM Acetat 20 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
Trenngelpuffer (4x) für SDS-PAGE (pH 8,8)	1,5 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS
Tris-Saline-Waschpuffer	10 mM Tris-HCl pH7,4 150 mM NaCl
Tris-Saline-Waschpuffer +TX100	10 mM Tris-HCl pH7,4 150 mM NaCl 0,005% (v/v) Triton® X-100

2.1.11 Medien für die Kultivierung der *Escherichia coli* Zellen

Bakterien Glycerolstock	65% Glycerol 100 mM MgSO ₄ 25 mM Tris-HCl pH 8,0
LB-Medium (Luria-Bertani)	10 g/l Trypton (Pepton) 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl mit 1M NaOH auf pH7 einstellen, autoklavieren Für LB-Agar 15 g/l Agar hinzugeben
SOC-Medium	30,7 g/l SOB-Medium, autoklavieren 20 mM Glukose (sterilfiltriert) hinzugeben
Super-Broth-Medium	35 g/l Trypton (Pepton) 20 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl mit 1M NaOH auf pH7 einstellen, autoklavieren

2.1.12 Medien und Reagenzien für die Kultivierung der *Plasmodium falciparum* Zellen

RPS	500 ml RPMI komplettiert mit 10% humanen Plasma
Cytomix	120 mM KCl 0,15 mM CaCl ₂ 2 mM EGTA 10 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,6 25 mM Hepes, pH 7,6
Freezing solution	28% Glyzerin 3% Sorbitol 0,65% NaCl in ddH ² O

2.1.13 Zellen und Organismen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>P. falciparum</i> 3D7		Gardner <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> PMC103	<i>mcrA</i> $\Delta(mcrBC-hsdRMS-mrr)$ 102 <i>recD sbcC</i>	Doherty <i>et al.</i> , 1993

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Für präparative Anwendungen wie z.B. Plasmidisolierungen, wurden die Bakterien in Super-Broth-Medium kultiviert. Als Festmedium wurde kommerziell erhältlicher LB-Agar verwendet. Als selektierendes Antibiotikum ist Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben worden. Die *E. coli*-Zellen wurden gegebenenfalls als Schüttelkulturen bei 240 rpm oder auf Festmedien bei 37°C unter aeroben Bedingungen kultiviert.

2.2.1.2 Mini-, Midi- und Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-Extraktion wurde mit Hilfe fertiger Reagenzien und, bis auf eine Abweichung in der Maxi-Präparation, gemäß den Protokollen der Firmen Qiagen bzw. Fermentas durchgeführt.

Diese Plasmid-Präparation beruht auf dem Einsatz einer Silika-Matrix Membran zur selektiven Bindung von Nukleinsäuren, wobei der Einsatz toxischer Substanzen entfällt. Bei der Präparation der Plasmid-DNA im Maxi-Format, die mit dem Kit der Firma QIAGEN durchgeführt wurde, wurden folgende Modifikationen nach JM Przyborski (Przyborski *et al.*, 2005) angewendet. *E. coli*-Zellen wurden in einem Ansatz von 400 ml Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Das daraus resultierende Bakterien-Pellet wurde anschließend mit doppelten Volumina der kommerziellen Pufferlösungen behandelt. Sich anschließende Schritte wurden wieder entsprechend Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

10 ml Super-Broth-Medium wurden mit Klonen einer einzelnen Kolonie des Stamms PMC103 inokuliert und bei 37°C über Nacht bis zur stationären Phase kultiviert.

Diese Vorkultur wurde nun 1:100 in 600 ml Super-Broth-Medium überführt und für 3,5 h bei 240 rpm und 37°C weiterkultiviert. Nach einer zehnminütigen Abkühlphase auf Eis wurden die Zellen bei 6.000 rpm in der Sorvall Zentrifuge für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis mit gekühlten Lösungen durchgeführt. Die sedimentierten Bakterien wurden in 600 ml ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Daraufhin wurden die Bakterien in 600 ml 10%igem Glycerin aufgenommen, erneut sedimentiert, mit 1,2 ml 10%igem Glycerin versetzt und zu je 100 µl aliquotiert. Die elektrokompenten Zellen konnten nun entweder für den direkten Gebrauch genutzt oder, nach Schock gefrieren in flüssigem Stickstoff, bei -70°C gelagert werden.

2.2.1.4 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

In eine gekühlte Elektroporations-Küvette wurden 5 µl des Ligationsansatzes vorgelegt. Darauf wurden 50 µl der, auf Eis aufgetauten, *E. coli*-Zellen gegeben. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene-Pulser der Firma Bio-Rad bei 2,5 kV (25 µF, 200 Ohm), wobei die Zeit des Pulses zwischen 3 und 4 msec liegen sollte.

Die Bakterien wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C auf dem Schüttler in einem 15 ml Röhrchen inkubiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss auf LB-Agar-Festmedium mit dem entsprechenden selektionierenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht im 37°C-Brutschrank kultiviert.

2.2.2 Arbeiten mit den Blutstadien von *Plasmodium falciparum*

2.2.2.1 Kultivierung, Synchronisation und Anreicherung von *P. falciparum*

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem Stamm 3D7 gearbeitet, welcher 2002 erfolgreich von Gardner und Kollegen sequenziert werden konnte (Gardner *et al.*, 2002). Für die *in vitro*-Kultivierung der asexuellen Stadien wurden verschließbare, sterile Plastikkulturflaschen verwendet. Die kontinuierliche Kultivierung erfolgte bei

37°C in RPMI 1640-Medium der Firma PAA, welches zuvor mit Hypoxanthin, Gentamicin, humanen Plasma und Erythrozyten der Blutgruppe A Rhesusfaktor positiv, komplettiert wurde. Neu transfizierte Plasmodien wurden in RPMI 1640-Medium der Firma GIBCO mit roten Blutkörperchen der Blutgruppe 0 Rh-positiv kultiviert.

Die Parasiten wurden entsprechend ihrer Stadien auf zwei unterschiedliche Arten synchronisiert. Die, in einem frühen Stadium nach der Invasion vorliegenden Plasmodien, sogenannte Ringstadien, wurden 4 h auf 4°C temperiert und anschließend weiter bei 37°C kultiviert. Weiter in ihrer Entwicklung fortgeschrittene Parasiten, die Trophozoiten, wurden demgegenüber mittels Gelafundin synchron gehalten. Diese Methode nutzt die sich verändernden Sedimentationseigenschaften der invadierten Wirtszelle, die mit der Ausbildung der elektronendichten Strukturen, sogenannten Knobs, einhergeht. Sie diente auch gleichzeitig als Methode zur Anreicherung infizierter roter Blutzellen. Dabei wurden die Parasiten zunächst für 2 min bei 3.000 rpm in einem 15 ml Röhrchen sedimentiert, anschließend mit 12 ml Gelafundin-Lösung versetzt und für 15 min in senkrechter Position in einem 37°C Wasserbad inkubiert. Während dieser Inkubationszeit bildet sich ein Zellsediment, welches hauptsächlich aus mit Ringstadien-infizierten und nicht-infizierten Erythrozyten besteht. In der löslichen Phase befinden sich die langsamer absinkenden, mit maturen Parasiten besiedelten roten Blutkörperchen, die im Anschluss in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt wurden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt, konnten die, mit Trophozoiten ankonzentrierten, infizierten Erythrozyten für eine Weiterkultivierung und etwaige Experimente verwendet werden.

2.2.2.2 Stabile Transfektion von *P. falciparum*-Blutstadien

Für die selektierbare episomale Transfektion wurden hoch synchrone Parasiten im Ringstadium mit einer Parasitämie von 5-10% verwendet. 100-150 µg präzipitierte Plasmid-DNA wurden in 15 µl steril-filtrierte TE-Puffer gelöst und anschließend mit 385 µl Cytomix versetzt. Dieser Ansatz wurde in eine Elektroporations-Küvette vorgelegt, auf den 200 µl sedimentierte, infizierte Erythrozyten gegeben wurden. Die

Elektroporation erfolgte bei 0.310 kV/950 μ F (high capacitance), wobei die Zeitkonstante zwischen 7 und 10 liegen sollte. Direkt im Anschluss wurden die Parasiten mit 12 ml Medium mit einem Hämatokrit von 3% versetzt und in eine neue Kulturflasche überführt. Nach sofortiger Begasung wurde die Kultur im Brutschrank kultiviert. Die Zugabe des selektierenden Additivs, bei dem es sich um WR99210 handelte, erfolgte nach 6-7 Stunden. 4-5 Tage fand alle 24 Stunden ein Mediumwechsel statt, bei dem stets auch die Zugabe des Additivs erfolgte. Im Anschluss daran wurde der Mediumwechsel auf alle 3-4 Tage reduziert, wobei alle 14 Tage die Kultur geteilt und mit neuem Blut versorgt wurde. Diese Kultivierung wurde beibehalten, bis im Ausstrich Parasiten zu finden waren. Diese wurden in große Kulturflaschen überführt und mit fortlaufender Additiv-Zugabe für Experimente sowie Cryopräservierung kultiviert.

2.2.2.3 Cryopräservierung und Auftauen von *P. falciparum* Blutstadien

Das Einfrieren bestehender Kulturen wurde mit Ringstadien ab einer Parasitämie von 3% durchgeführt. Dafür wurden die infizierten roten Blutkörperchen bei 3.000 rpm sedimentiert, mit 1 Volumen "freezing solution" versetzt und in Cryogefäße überführt. Diese wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Anschluss für 3-4 Tage bei -80°C gelagert, bevor sie für eine endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff konserviert wurden.

Für das Auftauen wurden die eingefrorenen Parasiten zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Daraufhin wurden sie in ein 15 ml Röhrchen überführt und mit 500 μ l einer 12%igen NaCl-Lösung versetzt. Bei diesem und den darauf folgenden Schritten war zu beachten, die Lösungen nur tröpfchenweise in einem Takt von 1 Sekunde zuzugeben. Nach einer Inkubation von 3-4 min wurden nun 5 ml einer 1,6%igen NaCl-Lösung zugeführt und erneut inkubiert. Abschließend wurde eine 0,9% NaCl- mit 0,6% Glukose-Lösung addiert. Die Zellen wurden anschließend für 2 min bei 3.000 rpm sedimentiert, einmal mit 10 ml RPS-Medium gewaschen und mit 12 ml Medium und neuem Blut der Blutgruppe 0 Rh-positiv versetzt. Anschließend wurden sie in eine neue Kulturflasche überführt, begast und bei 37°C im Brutschrank

kultiviert. Die Addition des selektierenden Additivs erfolgte 24 Stunden nach dem Auftau-Prozess.

2.2.2.4 Differentieller Aufschluss von infizierten Erythrozyten mittels Streptolysin O und Saponin

Parasiten wurden, je nach geplantem Experiment, durch zwei unterschiedliche Methoden von ihrer Wirtszelle isoliert.

Bei Streptolysin O (SLO) handelt es sich um ein zytolytisches Toxin, welches aus Gram-positiven Bakterien stammt. Dieses oligomerisiert an Cholesterol der Erythrozytenmembran und bildet dabei eine Pore, deren Durchmesser 30 nm erreichen kann (Palmer *et al.*, 1998). Diese Permeabilisierung führt zu einem Verlust des Erythrozytenzytosols, wobei der Parasit selbst, sowie die, den Parasiten umgebende, parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM) intakt bleiben.

Für 1×10^8 Zellen wurden, wenn nicht anders explizit aufgeführt, 2 hämolytische Einheiten (HE) verwendet, das in der Regel 8 µl SLO entspricht. Dabei definiert 1 HE den 50 prozentigen Verlust des Erythrozytenzytosols aus den infizierten roten Blutkörperchen. Die zuvor angereicherten infizierten Erythrozyten wurden zunächst 4 mal mit PBS pH7,4 bei Raumtemperatur (RT) gewaschen, wobei die ersten drei Sedimentationsschritte für 1 Sekunde bei 11.400 rpm und die abschließende für 5 min bei 4.500 rpm erfolgten. Die sedimentierten Zellen wurden im Folgenden in 92 µl PBS resuspendiert und mit 2 HE SLO versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 6 min bei RT, währenddessen in regelmäßigen Abständen eine kurze Durchmischung der Zellsuspension stattfand, wurde das Reaktionsgemisch bei 4.500 rpm für 4 min zentrifugiert. Um mögliche Zellkontaminationen zu sedimentieren, wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und ein erneutes Mal für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand konnte nun in ein weiteres neues Reaktionsgefäß überführt werden und stand im Anschluss weiteren experimentellen Schritten zur Verfügung. Das nach der SLO-Permeabilisierung erhaltene Zell-Pellet, bestehend aus den intakten Parasiten mit ihrer umgebenden PVM und der Erythrozytenmembran, wurde 4-8 mal mit 10 Volumen PBS pH7,4, wie oben beschrieben, gewaschen. Im Anschluss wurde das Sediment mit Tris-Lyse Puffer

versetzt, für 30 Sekunden auf einem Vortexer homogenisiert und schließlich, um eine vollständige Lyse zu erreichen, 3 mal für jeweils 30 Sekunden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die auf diese Weise aufgebrochenen Zellen wurden nun für 20 min bei 18.000 rpm sedimentiert. Sämtliche, in dem Gemisch vorhandene, lösliche Proteine befanden sich nun in der Überstand-Fraktion und konnten für nachfolgende Experimente weiter verwendet werden.

Bei Saponin handelt es sich um eine oberflächenaktive Substanz, deren amphipathische Eigenschaft es ermöglicht, Membranproteine in Lösung zu bringen. Zudem findet dieses Detergens Anwendung in der Lyse infizierter Erythrozyten (Beaumelle *et al.*, 1987). Bei dieser Art der subzellulären Fraktionierung werden sowohl die Membran der roten Blutkörperchen sowie die PVM zerstört, während der Parasit intakt bleibt.

1×10^8 mit Trophozoiten infizierte rote Blutkörperchen wurden, wie für SLO beschrieben, gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 μ l einer 0,1%igen Saponin-Lösung versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz erneut für 4 min bei 4.500 rpm sedimentiert, wobei eine Separierung der intakten Parasiten erfolgte. Der Überstand, der Bestandteile der Erythrozyten- sowie der PV-Membran, zudem noch sämtliche in ihnen vorhandene lösliche Proteine enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert. Der so behandelte Überstand wurde abermals in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und stand nun für weitere Analysen zur Verfügung. Das aus der Saponinlyse resultierende Pellet wurde 8 mal mit 10 Volumen PBS pH 7,4 gewaschen, wobei jeweils bei 4.500 rpm für 4 min sedimentiert wurde. Abschließend wurde das gereinigte Zellsediment mittels Tris-Lyse solubilisiert. Nach abschließender Zentrifugation für 20 min bei 18.000 rpm wurde die lösliche Fraktion, die die löslichen Proteine des Parasiten enthielt, für verschiedenste Analysen verwendet.

2.2.2.5 Behandlung der iRBZ mit dem Pilzmetabolit Brefeldin A (BFA)

Brefeldin A (BFA) zählt zu den makrozyklischen Laktonen und wird aus dem Organismus *Eupenicillium brefeldianum* gewonnen. Dieses Antibiotikum hemmt den intrazellulären Proteintransport und die Sekretion von Proteinen und findet daher

vielfältige Anwendungen in Proteintransport-Studien. Auch der Transport der meisten Parasitenkodierten sekretorischen Proteine weist eine BFA-Sensitivität auf (Benting *et al.*, 1994).

Transfizierte Parasiten im frühen Trophozoiten-Stadium, die unter Zugabe des stabilisierenden Dihydrofolat-Analogs WR99210 kultiviert wurden, wurden mittels Gelafundin angereichert, anschließend 3x mit RPS gewaschen und für 2 min bei 3.000 rpm sedimentiert. Die Zellen wurden daraufhin in drei verschiedenen Ansätzen für weitere 6 Stunden bei 37°C kultiviert. Zwei Drittel der Zellen wurden mit Brefeldin A in einer Endkonzentration von 5 µg/ml versetzt, wobei zu einem Drittel zusätzlich das Fusionsprotein-stabilisierende WR99210 in einer finalen Konzentration von 5 nM gegeben wurde. Als Kontrolle wurde ein Drittel weder mit BFA, noch mit WR99210 behandelt. Nach erfolgter Inkubation für 6 Stunden wurden die infizierten Erythrozyten mikroskopisch analysiert.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Bei Nukleinsäuren liegt das Maximum ihrer Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Daher kann die Nukleinsäure-Konzentration aus der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) ermittelt werden, indem dieser Wert mit der verwendeten Verdünnung (V), sowie einem für DNA bzw. RNA spezifischen, Multiplikationsfaktor (F) multipliziert wird. Daraus ergibt sich die Gleichung:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times V \times F (50/40/33)$$

Der Multiplikationsfaktor F ist der Wert, der sich ergibt, um für die jeweilig eingesetzte Art der Nukleinsäure eine optische Dichte von 1 zu erreichen. Dieser entspricht im Falle von doppelsträngiger DNA 50, da 50 µg pro ml einen OD-Wert von 1 liefern. Die Faktoren für einzelsträngige DNA bzw. einzelsträngige RNA sind 33 bzw. 40. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm. Daher lässt sich aus Quotienten von OD_{260} zu OD_{280} auch eine Aussage über die Proteinkontamination der Nukleinsäure treffen. Die OD reiner DNA und RNA sollte einen Wert von 1,8 aufweisen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere auf Kontamination mit Salzen oder Zuckern.

2.2.3.2 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Saiki *et al.*, 1988

Diese Methode ermöglicht eine millionenfache *in vitro*-Kopierung einer Nukleinsäuresequenz, wobei vorausgesetzt wird, dass die Anfangs- und Endsequenzen der Nukleinsäure bekannt sind. Die PCR ähnelt dem Reaktionsablauf der natürlichen Replikation. Bei dieser Amplifikation werden synthetische DNA-Oligonukleotide (Primer) verwendet, die an eine einzelsträngige Nukleinsäurematrize, der Template-DNA, binden. Von deren 3'-Ende aus synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Durch den Einsatz eines gegenläufigen Primers kann so gezielt die dazwischen liegende DNA vervielfältigt werden. Die Amplifikation resultiert dabei aus der zyklischen Wiederholung einzelner Reaktionsschritte, wodurch die Matrizen-DNA exponentiell vermehrt wird. Eine PCR beginnt zunächst mit einer thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei ca. 94-98°C für etwa 5-10 min, gefolgt von einer Primer-Hybridisierung an die entstandenen DNA-Einzelstränge. Um diese Bindung zu gewährleisten, sollten dabei beide Primer so gewählt sein, dass sie in ihrer Schmelztemperatur ähnliche Werte aufweisen. Eine herkömmliche Annealing-Temperatur, das ist die Temperatur, bei der die Primer binden können, liegt bei ca. 50°C. Auf diesem Weg wird die Polymerisation des dazwischen gelegenen Sequenzabschnittes eingeleitet, bei der sich die Temperatur an dem Optimum der eingesetzten Polymerase orientiert. Beispielsweise liegt das Temperaturoptimum des Enzyms *Taq*-Polymerase bei 72°C. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, werden diese Schritte in der Regel 25-35x wiederholt.

Tabelle 1: Basis-Protokoll einer Standard-PCR

Schritt-Nr.	Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1	Initiale Denaturierung	95	3-5
2	Denaturierung	95	0,5-1
3	Primer-Hybridisierung	T_m-5	0,5-1
4	Polymerisation	72	0,5-1
5	Abschließende Polymerisation	72	5-10

} 35
Zyklen

Die Schmelztemperatur (T_m) des Primers errechnet sich für Oligonukleotide bis 20 bp näherungsweise mit der Formel:

$$T_m = 4 \times (\text{Anzahl G und C}) + 2 \times (\text{Anzahl A und T})$$

Tabelle 2: Typische Zusammensetzung einer PCR mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl

Komponente	Menge bzw. Endkonzentration	Stammlösung
10 x Reaktionspuffer	1 x	10 x
MgCl ₂	0,5-5 mM	25 mM
dNTPs	0,1-0,5 mM	10 mM
5' Primer	50 pmol	0,1 µM
3' Primer	50 pmol	0,1 µM
Template-DNA	1 pg-500 ng	Variabel
Taq-Polymerase	0,25-0,5 U	5 U/µl

2.2.3.3 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Mit dieser Methode lassen sich spezifische RNA-Sequenzen in komplementäre DNA (cDNA) umschreiben und im Anschluss amplifizieren. Für die reverse Transkriptase und anschließende PCR wurde das SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit der Platinum® Taq von Invitrogen verwendet. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 25 µl und nach Herstellerangaben angesetzt.

Für die cDNA-Synthese wurde zunächst ein Zyklus für 30 min bei 50 °C durchlaufen. Anschließend wurden 40 Zyklen mit folgendem Programm wiederholt: 94 °C für 15 Sek. für die Denaturierung, 60 °C für 30 Sek. für das Annealing und 68 °C für 1 min für die Extension. Nach diesen Zyklen erfolgte eine abschließende Extension bei 68 °C für 5 min. Ein Zehntel der RT-PCR -Reaktion wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, um sowohl die Qualität, als auch die Quantität zu bestimmen.

2.2.3.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

Bei Agarose handelt es sich um ein Polysaccharid, das durch Aufkochen in Pufferlösung gelöst wird und beim Abkühlvorgang geliert. Dabei bilden sich Doppelhelices aus, die sich in Gruppen parallel zu Fäden zusammenlagern. Grundsätzlich erfolgt eine Größenanalyse bzw. Quantifizierung der aufgetrennten DNA durch Vergleich mit im Gel aufgetragenen Standard-DNA-Molekülen bekannter Größe bzw. Menge. Die Konzentration der Agarose betrug idR 1% (Maniatis *et al.*, 1982).

Die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld, die zur Trennung komplexer Gemische von Biomolekülen ausgenutzt wird, bezeichnet man als Elektrophorese. Bei den Gelelektrophoresen handelt es sich um ein trägergebundenes System, da hier die Separierung der einzelnen Substanzen nicht nur durch ihre Ladung, sondern auch durch einen Siebeffekt des Gels (Trägermaterials) erfolgt. Dabei hängt die elektrophoretische Beweglichkeit geladener Moleküle von mehreren Faktoren ab. Der Gesamt-Netto-Ladung, der Größe und Gestalt des Moleküls (Linear; Ringförmig mit Einzelstrangbruch oder Superhelikal), dem Vernetzungsgrad der Agarose, dem pH-Wert, der Temperatur und Ionenstärke des Puffers und schließlich auch von der Stärke des elektrischen Feldes. Die in TAE-Puffer gelöste Agarose wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen und nach dem Abkühlen direkt in eine, mit TAE-Puffer gefüllte, Gelelektrophorese-Kammer überführt. Um eine Diffusion der DNA in den Laufpuffer zu verhindern, wurde die Probe vor dem Auftragen mit einem DNA-Ladepuffer (5x) versetzt, der die Dichte erhöht und so ein Absinken der DNA-Lösung in die Taschen ermöglicht. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Um eine Visualisierung der Moleküle im Gel zu ermöglichen, wurde die Nukleinsäure mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid gefärbt, welches zuvor in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml in die Agarose gegeben wurde. Ethidiumbromid interkaliert mit seinem Ringsystem zwischen die Basen der Nukleinsäure. Nach Anregung mit UV-Licht (254, 302 oder 366 nm), erscheint der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex im sichtbaren Bereich (500-590 nm) als rot-orange leuchtende Bande. In Agarose-Gelsystemen ist auf diese Weise eine Menge von bis zu 5 ng DNA detektierbar.

2.2.3.5 **Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen**

(Gelextraktions-Kit, Seqlab)

Dieses Prinzip beruht auf der Solubilisierung der Agarose mit anschließender selektiver Bindung der zu eluierenden DNA an Silika-Partikel.

Zunächst wurde die DNA mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten. Durch die Zugabe von 500 µl Bindungspuffer und anschließender Inkubation bei 50°C für 10 min im Thermomixer wurde die Agarose gelöst. Das chaotrope Salz in diesem Puffer unterbricht Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Zuckern des Agarose-Polymers und löst zusätzlich DNA-Binde-Proteine von der Nukleinsäure ab. Auf diesen Reaktionsansatz wurden nun 250 µl Isopropanol zugegeben, invertiert und sofort auf eine Silikasäule geladen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min bei 13.000 rpm wurde die Probe 2x mit 500 µl Waschpuffer PE gewaschen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt ohne Zugabe eines Puffers, um sämtliche Restbestände an Puffern zu entfernen. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte mittels 30 µl eines leicht alkalischen Elutionspuffers (10 mM Tris-HCl, pH 8,5). Nach einem Zentrifugationsschritt von 30 Sek. bei 13.000 rpm, stand nun das Eluat mit der extrahierten DNA weiteren molekularbiologischen Anwendungen zur Verfügung.

2.2.3.6 **Präzipitation von DNA**

Nukleinsäuren können aus salzhaltigen wässrigen Lösungen durch Zugabe von Ethanol präzipitiert werden (Hengen *et al.*, 1996). Um Nukleinsäuren von Kontaminationen zu befreien bzw. um sie anzukonzentrieren, wurde die DNA-Lösung zunächst mit 2 Volumen 100%igem EtOH und 0,1 Volumen 3M Na-Acetat (pH 5,2) versetzt und 30 min bei -20°C gefällt. Daran schloss sich eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C an. Das entstandene DNA-Präzipitat wurde anschließend mit 500 µl 70%igem EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet bei 50°C getrocknet und in der gewünschten Menge ddH₂O oder TE-Puffer aufgenommen.

2.2.3.7 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wird mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Diese Enzyme erkennen, je nach Spezifität, vier bis acht Basenpaare und schneiden den DNA-Doppelstrang an dieser Sequenz. Bei den Basenpaaren handelt es sich in den meisten Fällen um Palindrome und in der Regel generieren diese Enzyme Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende, wobei die Enden entweder glatt (blunt ends) oder überstehend (sticky ends) sind. In einem Restriktionsansatz wurden 0,2-3 µg DNA zusammen mit einem für das Enzym spezifischen Puffer (10x) und bis zu 10 U pro Endonuklease für 2-12 h bei der optimalen Wirkungstemperatur verdaut. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Ergebnis mit Hilfe eines Agarosegels überprüft.

2.2.3.8 Insertion von DNA-Sequenzen in Plasmide

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor einzubringen, wurde die Plasmid-DNA zunächst mit spezifisch gewählten Restriktionsenzymen linearisiert. Das einzubringende DNA-Fragment wurde ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen inkubiert, um eine anschließende Ligation zu ermöglichen. Für die Ligation wurden 100 ng Vektor-DNA eingesetzt. Die Menge an einzusetzendem Insert kann nach der folgenden Formel kalkuliert werden, die sowohl die Größe des Vektors als auch die des Inserts berücksichtigt:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Insert [kb]}}{\text{Vektor [kb]}} \times \frac{3}{1} = \text{Insert [ng]}$$

Von der T4-DNA-Ligase (Invitrogen) wurden in einem 20 µl-Reaktionsansatz 3-6 Units (U) eingesetzt, mit 0,1 Volumen Ligasepuffer (10x) und ddH₂O komplettiert und nach Zugabe von Insert-DNA und linearsiertem Plasmid für 12 h bei 16 °C inkubiert.

2.2.3.9 Kolonie-PCR

Nach erfolgter Transformation ermöglicht die Kolonie-PCR, eine Bakterienkolonie auf eine erfolgreiche Klonierung des gewünschten Inserts im Vektor hin zu analysieren. Die Zellen wurden zunächst auf eine Replikaplatte übertragen und anschließend in einen PCR-Reaktionsansatz überführt. Das Volumen des Ansatzes betrug 25 µl und fügte sich aus 0,1 Volumen Reaktionspuffer (10x), 2 mM dNTPs, je 1,25 µM Primer und 1 U *Taq*-Polymerase zusammen. Um eine Amplifikation bereits auf der Platte vorhandener DNA zu vermeiden, entsprach ein verwendeter Primer dem Beginn oder Ende des Inserts, während der andere Primer in der Plasmid-Sequenz ansetzte.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970

Das Grundprinzip der elektrophoretischen Trenntechnik ist die Wanderung eines Proteingemisches in einer Gelmatrix in einem elektrischen Feld. Bei dieser Form der Gelelektrophorese werden die Proteine in Gegenwart von 0,1%gem Natriumdodecylsulfat (SDS) nur aufgrund ihres Molekulargewichtes in Richtung Anode getrennt. Dieses Detergenz lagert sich so effektiv an die Proteine an, dass die entstehenden SDS-Proteinkomplex-Mizellen nach außen hin gerichtete negative Sulfatgruppen aufweisen und so die Eigenladungen der einzelnen Proteine überdeckt werden. Durch die Zugabe von Dithiothreitol (DTT) kommt es zusätzlich noch zu einer Reduktion von Disulfidbrücken. Polyacrylamid bildet durch die Polymerisation des monomeren Acrylamids und des quervernetzenden N, N'-Methylenbisacrylamids ein dreidimensionales Netzwerk aus. Die Porengröße eines Gels wird dabei durch das Verhältnis der Konzentrationen von Acrylamidmonomer zu quervernetzendem Bisacrylamid festgelegt, wobei z.B. niederprozentige Gele große Poren aufweisen und damit großen Molekülen nur wenig Widerstand leisten.

Für die Auftrennung der Proteine wurden vertikale Gelkammern verwendet, die vor Gebrauch mit 70 prozentigen EtOH und mit ddH₂O gesäubert wurden. Die Kammern

bestehen aus zwei Glasplatten, die durch einen Abstandshalter mit einer Breite von entweder 0,75 oder 1 mm separiert wurden. In dem entstandenen Raum wurde zuerst das Trenngel eingegossen und mit 50%igem Isopropanol überschichtet, welches nach Auspolymerisierung des Gels wieder entfernt wurde. Im Anschluss wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegeben, in das ein Kamm für die verschiedenen Proteinproben eingebettet wurde. Nachdem der Kamm aus dem Sammelgel entfernt wurde, konnte das Gel in die Elektrophorese-Apparatur gestellt und die zuvor mit Probenpuffer versetzten und für 12 min aufgekochten Proteingemische in die Taschen geladen werden. Zur Größenbestimmung wurde dabei jeweils ein Proteinstandard definierter Masse verwendet.

2.2.4.2 Semi-Dry-Immunoblotting nach Towbin *et al.*, 1979

Mittels einer Semi-Dry-Blotkammer wurden die Proteine von dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, die Proteine via hydrophobe Wechselwirkungen bindet. Für den Transfer wurden insgesamt 6 Whatman-Papiere und eine Nitrocellulosemembran in der Größe des SDS-Gels ausgeschnitten und in Semi-Dry-Blotpuffer befeuchtet. Dieser Puffer wurde zuvor durch Methanol komplettiert, um die Proteinbindungsstellen der Membran zu aktivieren. Auf die untere, als Kathode fungierende Platinelektrode wurden drei aufeinander geschichtete Filterpapiere gelegt, darauf das SDS-Gel platziert, gefolgt von der Nitrocellulosemembran und weiteren drei Whatman-Papieren. Anschließend wurden entstandene Luftblasen entfernt, die obere Elektrode (Anode) der Blotkammer befestigt und eine Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 1 h angelegt. Die auf diese Weise auf die Membran transferierten Proteine wurden im Anschluss mit Ponceau-S angefärbt und gleichzeitig durch die darin enthaltende Trichloressigsäure fixiert. Durch anschließende Zugabe von PBS pH7,4 wurde die reversible Färbung von der Membran gewaschen und mit einer 5%igen Blockmilch-Lösung für 1 h inkubiert um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran in eine 1. Antikörper-Lösung überführt und für 12 h bei 4°C inkubiert. Daran schlossen sich drei 15 minütige Waschschrte mit Tris-Saline-Puffer und Tris-Saline-Puffer + TX100 an. Danach wurde der Blot mit der, mit einem Enzym gekoppelte, 2. Antikörper-Lösung für 1 h bei

RT inkubiert. Der 2. Antikörper ist gegen die Fc-Region des 1. AK gerichtet und verstärkt so das Signal. Durch das gekoppelte Enzym am 2. AK erfolgt die Detektion des spezifischen Antigens auf dem Blot. Die verwendeten 2. AK waren entweder mit alkalischer Phosphatase (AP) oder Merrettich-Peroxidase (Horse Raddish Peroxidase, HRP) markiert. Bei HRP gekoppelten Antikörpern erfolgte die Detektion über eine Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Reaktion (Ogata *et al.*, 1983). Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst dadurch eine Chemolumineszenz aus, dessen Licht mit einem Röntgenfilm gemessen werden kann. Bei AP markierten Antikörpern wurde die Immunfärbung mit dem NBT/BCIP-System durchgeführt (Blake *et al.*, 1984). Nach erfolgter Färbung wurde die Membran mit Leitungswasser abgespült und dadurch die weitere Färbereaktion gestoppt.

2.2.4.3 Protease-Protektions-Assay

Um zu belegen, dass exprimierte DHFR-Fusionsproteine in ihrer gefalteten Konformation durch die Zugabe eines Dihydrofolat-Analogs stabilisiert werden können, wurde ein Protease-Protektions-Assay etabliert. Diese spezifische Stabilisierung resultiert in einer verstärkten Degradations-Resistenz gegenüber Proteasen (Eilers und Schatz, 1986, Hausler *et al.*, 1996).

Trophozoiten die ein Fusionsprotein, bestehend aus DHFR und GFP exprimierten, wurden zunächst mittels Gelafundin ankonzentriert. Mit 1×10^9 infizierten Erythrozyten wurde anschließend eine Saponinlyse durchgeführt. Eine Extraktion der löslichen, zytoplasmatischen Proteine erfolgte durch Aufnahme des Saponin-Pellets in 500 μ l Tris-Lyse-Puffer und anschließendem dreimaligen Einfrierens in flüssigem Stickstoff. Nach einer Sedimentation der unlöslichen Membranbestandteile für 20 min bei 18.000 rpm und 4°C, wurde die lösliche Fraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für den Assay wurde pro Reaktionsansatz ein Zelläquivalent von 5×10^7 verwendet. Aliquote Teile der löslichen Fraktion wurden zunächst mit 10 μ M bzw. 100 μ M Aminopterin, 100 μ M WR oder DMSO als Kontrolle versetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis, wurde weiterhin Trypsin in einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml oder Tris-Lyse-Puffer als Negativ-Kontrolle zugegeben. Diese

Reaktionsansätze wurden ein weiteres Mal geteilt, wobei je eine Hälfte der verschiedenen löslichen Fraktionen zudem mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) behandelt wurde, um einen proteolytischen Abbau zu verhindern. Als eine weitere Kontrolle wurden 2 Reaktionsansätze ohne stabilisierende Additiva verwendet, wobei einer Hälfte Tris-Lyse-Puffer und der anderen Hälfte PIC zugegeben wurde. Diese Ansätze wurden für 14 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend analysiert.

2.2.4.4 Ultrazentrifugation infizierter Erythrozyten

Zunächst wurden die, mit transfizierten Parasiten, infizierten RBZ durch Gelafundin ankonzentriert. Im Anschluss erfolgte eine hypotone Lyse der Zellen mit Tris-Lyse-Puffer in Anwesenheit eines Protease-Inhibitor-Cocktails, gefolgt von dreimaligen Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff. Nach einer Sedimentation der Membranbestandteile für 20 min bei 18.000 rpm, wurde die lösliche Fraktion erneut für 2 Stunden bei 30.000 g und 4°C zentrifugiert. Von dieser Überstand-Fraktion wurde anschließend für spätere Analysen ein Aliquot, korrespondierend zu einem Zelläquivalent von 1×10^7 , entnommen. Auf 50 µl eines 0.2 M Saccharose-Kissen wurden nun 100 µl der löslichen Fraktion pipettiert und für 2 Stunden bei 100.000 g in der Ultrazentrifuge sedimentiert. Die daraus resultierende Überstand- und Pelletfraktion konnte nun biochemisch mittels Western Blot und anschließender Antikörper-Inkubation, gefolgt von einer Enhanced Chemoluminescence (ECL)-Reaktion, analysiert werden.

2.2.4.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopischen Analysen wurden an einem inversen Mikroskop für Durchlicht und Auflichtmikroskopie, dem Axio Observer der Firma Zeiss durchgeführt.

Die Zellkerne wurden mit dem Farbstoff Hoechst 33258 (Invitrogen), einem kationischen DNA-Binder, in einer Verdünnung von 1:2000 visualisiert. Zeitraffer-Aufnahmen wurden in der höchstmöglichen Geschwindigkeit und mit reduzierter

Lichtintensität durchgeführt, um ein Ausbleichen der Proben zu minimieren. Gleichzeitig wurde eine gesteigerte Sensitivität erreicht, indem eine 16fache Signalamplifikation eingestellt wurde.

2.2.4.6 *In vivo* SLO-Lyse infizierter Erythrozyten

1 ml mit Trophozoiten infizierte Erythrozyten wurden, nach einmaligem Waschen mit RPMI, in 2 ml RPMI resuspendiert. Ein Aliquot mit einem Volumen von 10 µl wurde anschließend auf eine, mit Poly-L-Lysin beschichtete, Glasschale transferiert, auf der 100 µl PBS pH 7,4 vorgelegt waren. Nach einer kurzen Ruhezeit, währenddessen die Zellen absinken konnten, wurden diese mikroskopisch untersucht.

Für die *in vivo* SLO-Lyse wurden 2 HE SLO auf die Zellen pipettiert und sofort beobachtet. SLO permeabilisiert präferentiell nicht-infizierte rote Blutkörperchen (Jackson *et al.*, 2007). Sobald eine Lyse dieser Erythrozyten zu beobachten war, wurde eine Zeitpunkt-Messung gestartet, die automatisch für 30 Sekunden regelmäßig Aufnahmen der permeabilisierenden Zellen erstellte.

2.2.4.6 Immunfluoreszenz-Assay (IFA) nach Tonkin

Für diese indirekte Immunfluoreszenz wurden 2×10^8 , mit Trophozoiten infizierte Erythrozyten eingesetzt. Die Zellen wurden zu Beginn einmal mit 1 ml PBS pH 7,4 gewaschen und für 2 min bei 3.000 rpm sedimentiert. Danach folgte der Fixierungsschritt, mit einer 4 prozentigen Paraformaldehyd- und 0,0075 prozentigen Glutaraldehydlösung, das die Morphologie der Zellen konserviert. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C in einem Thermomixer, wurden die fixierten Zellen erneut sedimentiert und gewaschen. Um den Antikörpern die Zellen zugänglich zu machen, wurden diese im Anschluss in 1 ml Permeabilisierungspuffer, bestehend aus 0,1 prozentigen Triton-X-100 in PBS pH 7,4, resuspendiert. Die Permeabilisierung erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Laborroller. Nach erneuter Sedimentation der infizierten Erythrozyten, wurden die Zellen mit 1 ml eines Quenching-Puffers versetzt, der aus einer 125 mM Glycin-Lösung bestand.

Auch diese Lösung wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen ein weiteres Mal bei 3.000 rpm für 2 min zentrifugiert wurden, wurden sie mit 1 ml einer Blocklösung, bestehend aus 3 prozentigem bovinen Serum Albumin in PBS pH 7,4, versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde, nach einem weiteren Sedimentationsschritt, die Blocklösung verworfen und die Zellen mit einer Primär-Antikörper-Lösung gemischt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Laborroller. Daraufhin wurden die Zellen dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen, wobei je eine Inkubation von 10 min eingehalten wurde und schließlich mit einer Sekundär-Antikörper-Lösung versetzt, die 1 Stunde bei RT inkubiert wurde. Abschließend wurden die infizierten Erythrozyten wiederholt 3x mit 1 ml PBS pH 7,4 gewaschen, wobei während des letzten Schrittes die Zugabe von Hoechst 33258, in einer Verdünnung von 1:100.000, erfolgte. Die Zellen konnten nun in einem angemessenen Volumen PBS pH 7,4 aufgenommen und mikroskopisch analysiert werden.

2.2.4.7 Bildbearbeitung mittels Image J

Image J wurde von Wayne Rasband am National Institutes of Health (NIH) als ein javabasiertes Programm entwickelt. Durch eine Vielzahl von Erweiterungen, sogenannten Plug-ins, kann dieses Programm individuell an die eigenen Bedürfnisse angepasst werden.

Für eine Vereinheitlichung der importierten Aufnahmen wurden alle in 8-bit greyscale konvertiert und es wurde eine Substraktion des Hintergrundes vorgenommen.

Für die Visualisierung der *in vivo* SLO-Lyse wurde zudem ein Makro verwendet, welches von J. Rietdorf (EMBL Heidelberg) entwickelt wurde und eine automatische Korrektur des Ausbleichens während der Fluoreszenzaufnahmen durchführt. Für die Falsch-Kolorierung der Zellen wurde die Lookup-Tabelle brgbcmyw (LUT) verwendet.

3. Ergebnisse

Während seiner intraerythrozytären Entwicklung etabliert der Parasit *Plasmodium falciparum* innerhalb seiner Wirtszelle eine Proteintransportmaschinerie, um seine Vermehrung und damit sein Überleben zu gewährleisten. Konsequenzen dieser Modifikationen sind unter anderem die Ausbildung der Knobs mit einhergehender Zytoadhärenz der roten Blutkörperchen an die Endothelien der Blutgefäße, welches letale Folgen für den Menschen haben kann (Crabb *et al.*, 1997, Wickham *et al.*, 2001).

Sekretorische Proteine müssen dabei nicht nur über die parasitäre Plasmamembran, sondern auch über die Vakuolenmembran (PVM) transportiert werden, die während der Invasion in dem Erythrozyten etabliert wird. Die genauen Transportmechanismen über die PVM sind dabei im Detail noch nicht aufgeklärt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der Einfluss des Faltungszustandes löslicher Proteine während des Transports über die PVM aufgeklärt werden. Um die Konformation dieser Proteine zu untersuchen, wurde ein Dihydrofolat Reduktase (DHFR) Fusionsprotein-System etabliert und angewendet.

3.1 Das DHFR Fusionsprotein-System für die Untersuchung des Faltungszustandes während der Proteintranslokation über die PVM

Dieses System basiert auf der Grundlage, dass Folat-Analoga, wie z.B. Aminopterin (AP) an das Enzym DHFR binden können. Diese Bindung und einhergehende Inhibition resultiert dabei in einer Stabilisierung der Tertiärstruktur des Proteins, welches für Translokationsprozesse auch nicht von Chaperonen entfaltet werden kann (Salvador *et al.*, 2000). Daher kann die Translokation eines Fusionsproteins mit einer DHFR-Sequenz durch die Zugabe von AP inhibiert werden, falls für diesen Prozess eine Entfaltung des Proteins notwendig ist. Dieses System wurde unter anderem bereits für Translokationsstudien in Mitochondrien, Lysosomen und Glykosomen angewendet (Eilers und Schatz, 1986, Hausler *et al.*, 1996, Wienhues *et al.*, 1991).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden mehrere Fusionsproteine, bestehend aus parasitären N-terminalen Sequenzen, gefolgt von DHFR und dem Grün fluoreszierenden Protein (GFP) generiert, dessen Export *in vivo* unter dem Einfluss eines Folat-Analogs mittels verschiedener Methoden untersucht wurde.

Zum Einen wurden die Zellen mikroskopisch mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops analysiert, bei dem sowohl lebende Zellen untersucht wurden, als auch solche, die zuvor fixiert und dann für eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse verwendet wurden. Zum Andern wurden die transfizierten Parasiten biochemisch analysiert. Dabei kamen Zellfraktionierungstechniken, unter Verwendung des porenformenden Toxins Streptolysin O (SLO) zum Einsatz, die eine Separierung des Wirtszellzytosols von der PV, dem Parasiten und deren Membranen ermöglichen, gefolgt von SDS-PAGE und Western-Blot. Die verschiedenen Fraktionen lassen dadurch, unter Berücksichtigung der korrekten Verteilung bestimmter Markerproteine, eine Aussage über die Lokalisation des Fusionsproteins zu (Ansorge *et al.*, 1996).

3.1.1 Generierung der Fusionsprotein-exprimierenden Parasitenstämme

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene Expressionsplasmide hergestellt, die in *P. falciparum* transfiziert und anschließend auf ihre Expression und Lokalisation in der Zelle hin untersucht wurden. Die folgenden Ergebnisse wurden durch die Untersuchung von vier verschiedenen Plasmide erzielt, die im folgenden Abschnitt eingehender charakterisiert werden.

Als Expressionsvektor wurde das Plasmid pARL2+ verwendet, welches eine stabile episomale Transfektion ermöglicht, deren Aufrechterhaltung in den Parasiten mit der kontinuierlichen Selektion durch die synthetische Droge WR99210 gewährleistet wird (Przyborski *et al.*, 2005, Crabb und Cowman, 2004). Zunächst wurde in den Vektor *gfp* und das murine *dhfr* ligiert. Das entstandene Plasmid pARL^{DG} wurde verwendet, um das DHFR Fusionsprotein-System in *Plasmodium* zu testen und zu etablieren. Anschließend wurden die kodierenden Sequenzen der ersten 80 AS von STEVOR (sub telomeric open reading frame) bzw. der ersten 150 AS von GBP130 (Glycophorin binding protein 130) in das Plasmid vor *dhfr* und *gfp* kloniert, welche in

Zukunft als pARL^{SDG} (S steht für STEVOR) und pARL^{GDG} (G steht für GBP130) bezeichnet werden.

Bei STEVOR handelt es sich um ein exportiertes Transmembranprotein, welches in der Membran der Maurerschen Spalten lokalisiert ist. Die ersten 80 AS beinhalten eine typische N-terminale Signalsequenz, sowie ein PEXEL-Motiv, dass eine Translokation über die PVM in die Wirtszelle ermöglicht. Extensive Studien an diesem Protein haben ergeben, dass diese Anzahl an AS ausreichend ist, ein Fusionsprotein in das Zytoplasma der Wirtszelle zu leiten. Da in dieser Sequenz keine Transmembrandomäne vorhanden ist, sollte sich das Fusionsprotein wie ein lösliches Protein verhalten und dementsprechend löslich in der Wirtszelle vorliegen (Przyborski *et al.*, 2005). Die ersten 80 AS wurden verwendet, um als Positiv-Kontrolle zu dienen, da hier bereits eine erfolgreiche Translokation über die PVM gezeigt werden konnte.

GBP130 ist ein lösliches Protein, über deren Funktion keine genauen Informationen vorliegen. Die ersten 150 AS beinhalten ein PEXEL-Motiv beginnend an der AS Position 83, jedoch verfügt das Protein über keine klassische N-terminale Signalsequenz, sondern eine, dem aminoterminalen Ende entrückte hydrophobe Sequenz. Auch an diesem Protein wurden bereits Lokalisationsstudien durchgeführt, die auf eine duale Verteilung des Proteins sowohl in der PV, als auch im Zytosol des Erythrozyten hindeuten, wobei der dominante Anteil im Letzteren zu finden ist (Ansorge *et al.*, 1996). Zudem wurde Ende 2004 die Funktion des PEXEL/HT-Motiv unter anderem anhand des GBP130 aufgeklärt. Dafür wurden die ersten 99 AS des Proteins verwendet, welche eine Translokation über die PV erlaubten. Anfängliche Studien unter Verwendung der ersten 99 AS mit DHFR und GFP, ließen in unseren Studien allerdings keine Translokation zu. Auch durch die Einführung eines 10-Alanin-Linkers zwischen die kodierende Sequenz von GBP130 und DHFR wurde keine Translokation beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Sequenz von GBP130 wurde gewählt, da es sich bei diesem Protein, im Gegensatz zu STEVOR, um ein original lösliches Protein handelt und eine mögliche Falschaussage, die durch STEVOR hervorgerufen werden könnte, zu vermeiden.

Abschließend wurde schließlich noch ein Plasmid generiert, welches die kodierende Sequenz für die ersten 150 AS von GBP130, gefolgt von GFP beinhaltet. Dieses

pARL^{GG} diene der Überprüfung, ob eine Überexpression eventuelle Auswirkungen auf die Lokalisation des Fusionsproteins haben könnte.

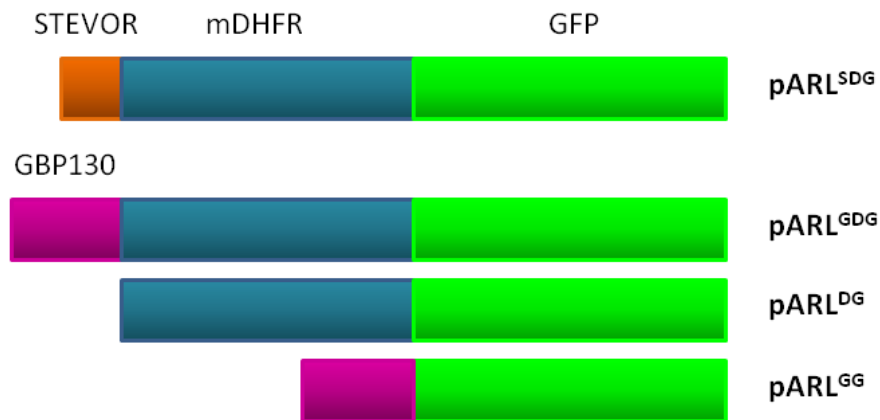


Abbildung 7: Schematische Darstellung der verwendeten Fusionsproteine

DG= DHFR-GFP, SDG= STEVOR (AS 1-80)-DHFR-GFP, GDG= GBP130 (AS 1-150)DHFR-GFP, GG= GBP130 (AS 1-150) GFP, Blau steht für DHFR, Grün für GFP, Orange für STEVOR und Pink für GBP130, von Links nach Rechts entspricht der Orientierung vom N- zum C-terminalen Ende.

Die Inserts der fertig gestellten Vektoren wurden im Anschluss sequenziert und in Ringstadien von *P. falciparum* des Stammes 3D7 transfiziert. Nach erfolgreicher Selektion konnten die transfizierten Parasiten auf eine Expression und Lokalisation der Fusionsproteine hin untersucht werden.

3.1.2 Etablierung des DHFR Fusionsprotein-Systems

Um das DHFR Fusionsprotein-System zu etablieren, wurden Parasiten mit dem Expressionsplasmid pARL^{DG}, das für ein Fusionsprotein bestehend aus DHFR und GFP kodiert, transfiziert. Nach erfolgter Selektion durch WR99210 wurden die ersten Parasiten 23 Tage nach der Transfektion durch einen Ausstrich nach Giemsa-Färbung gesichtet.

Zunächst wurden die Parasiten dahingehend überprüft, ob eine erfolgreiche Transfektion stattgefunden hat und ob eine Fluoreszenz detektierbar ist. Dafür wurden, mit Trophozoiten infizierte Erythrozyten mit dem DNA bindenden

3. Ergebnisse

Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 versetzt und auf einen Objektträger überführt. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Axio Observer der Firma Zeiss.

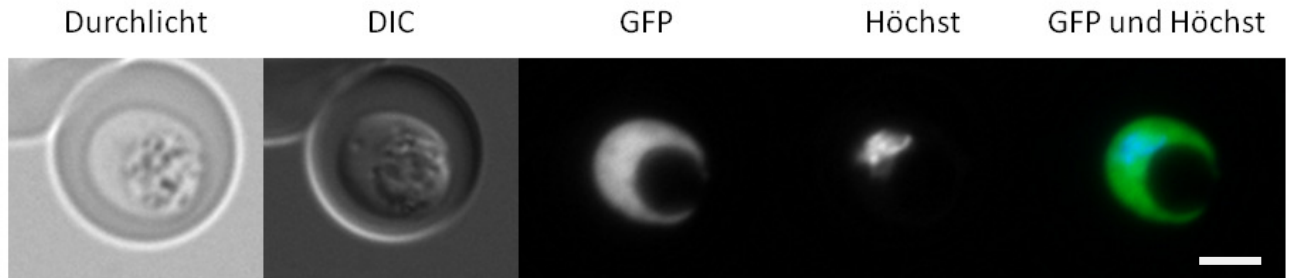


Abbildung 8: Mikroskopische Analyse der DHFR-GFP exprimierenden Zellen

DIC= Differenzeller Interferenz Kontrast, der weiße Balken entspricht 2µm

Wie in Abb.8 zu erkennen ist, kann eine deutliche GFP-Fluoreszenz innerhalb des Parasiten detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich eine funktionelle Chromophore innerhalb des Grün-fluoreszierenden-Proteins bilden konnte. Da das Fusionsprotein keine Signalsequenz aufweist, wird das Fusionsprotein im Zytoplasma des Parasiten exprimiert. Diese Lokalisation wird zudem durch die auffallende Nahrungsvakuole (NV) bestätigt, die keine Fluoreszenz aufweist und darauf schließen lässt, dass das Fusionsprotein nicht exportiert und nicht durch Nährstoffaufnahme unspezifisch in die Nahrungsvakuole aufgenommen wurde.

3.1.3 Stabilisierung des Fusionsprotein DG durch das Folat-Analog Aminopterin (AP)

Die Voraussetzung des DHFR-Fusionsprotein Systems ist eine erfolgreiche Stabilisierung des Fusionsproteins in seiner gefalteten Konformation durch die Zugabe von Folat-Analoga. Um herauszufinden, ob eine Stabilisierung stattfinden kann, wurde zunächst ein Protease-Protektions-Assay durchgeführt, da eine Bindung in einer hochgradigen Resistenz gegenüber der Degradation durch Proteasen resultiert (Salvador *et al.*, 2000). Dazu wurden 1×10^9 infizierte Erythrozyten zunächst mit einer Saponin-Lösung lysiert (Beaumelle *et al.*, 1987). Die lösliche Parasitenfraktion wurde anschließend durch dreimaliges Auftauen und Einfrieren in

3. Ergebnisse

flüssigem Stickstoff unter Verwendung von Tris-Lyse-Puffer und nachfolgender Zentrifugation bei 18.000 rpm und 4°C gewonnen. Diese Fraktion wurde nun in fünf Fraktionen aliquotiert, wobei ein Aliquot sofort mit Probenpuffer versetzt wurde. Diese Probe diente als Positivkontrolle für die Funktionalität der Antikörper. Zu den anderen Proben wurden jeweils zur Hälfte AP bzw. DMSO zugefügt. Zusätzlich wurde jeweils eine AP-haltige, sowie eine DMSO-haltige Probe mit Trypsin versetzt. Diese Ansätze wurden für 14 Stunden bei 37°C inkubiert, danach mit Probenpuffer versehen und durch Aufkochen fertiggestellt. Alle so erhaltenen Fraktionen wurden abschließend auf ein 12%iges SDS-Gel geladen und nach einem WB wurden die Fraktionen auf das Vorhandensein von GFP und *P. falciparum* HSP70 (PfHSP70) durch Inkubation mit diesen Antikörpern mittels ECL überprüft.

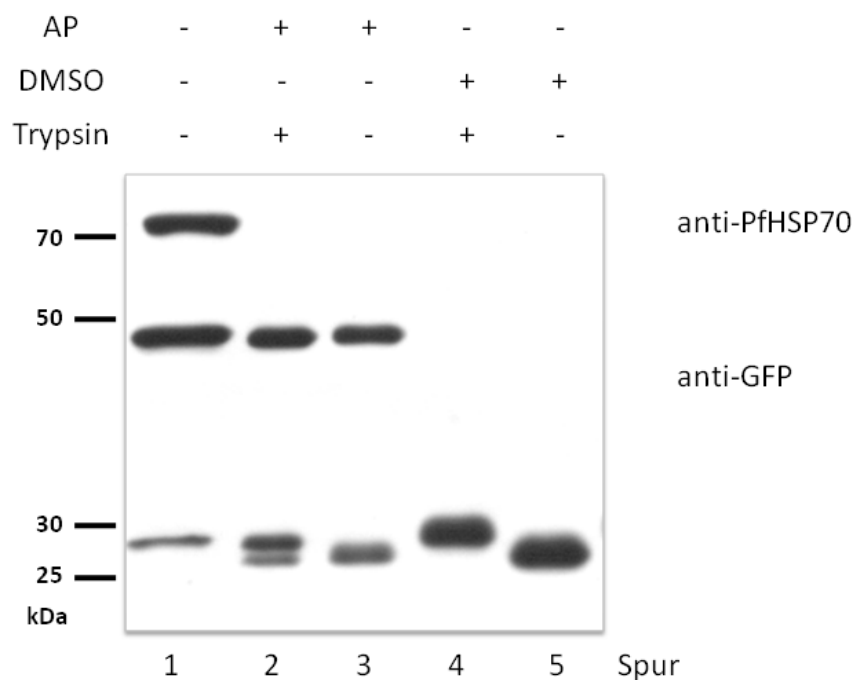


Abbildung 9: Protease-Protektions-Assay unter Verwendung von Aminopterin (AP)

Die lösliche Proteinfraction des Saponinpellets DHFR-GFP exprimierender Zellen wurde für 14 h bei 37°C in Anwesenheit (+) von AP (10µM), DMSO und Trypsin oder ohne die Zugabe dieser Substanzen (-) inkubiert. Zelläquivalente von 10^7 Zellen wurden durch SDS-Page und WB unter Verwendung von GFP- und PfHSP70-Antikörper analysiert.

Abb.9 zeigt die ECL-Detektion von GFP und PfHSP70. PfHSP70 wurde als Indikatorprotein zur Visualisierung eines erfolgreichen Verdaus durch das Enzym Trypsin verwendet. In der Spur 1 ist die Fraktion, die zu dem Zeitpunkt 0h

entnommen wurde, aufgetragen. Sowohl PfHSP70 als auch das Fusionsprotein, mit einer theoretischen Größe von 46,5 kDa sind eindeutig detektierbar. Zu dem Protein in seiner vollen Länge ist zudem ein kleineres Fragment zu sehen, welches einer Größe von etwa 27 kDa entspricht und wahrscheinlich, wie bereits berichtet, GFP alleine darstellt (Przyborski *et al.*, 2005). Dieses Ergebnis bestätigt zum Einen die erfolgreiche Expression des Proteins. In den Spuren 2 und 3 wurden die Proben aufgetragen, die in Anwesenheit von AP inkubiert wurden. Dabei wurde der Probe in der zweiten Spur zusätzlich noch Trypsin zugesetzt. In beiden Fraktionen kann eindeutig das vollständige Fusionsprotein detektiert werden, was auf eine erfolgreiche Stabilisation des Proteins durch das Folat-Analog Aminopterin schließen lässt. Hingegen lassen die Spuren 4 und 5 keine Detektion des Fusionsproteins in voller Länge zu. Diese Spuren zeigen die Aliquote, die ohne stabilisierendes AP, dafür aber unter Zugabe von DMSO für 14 h inkubiert wurden. Das lässt darauf schließen, dass DMSO keinen Effekt auf die Faltungsstabilität oder auf die Effizienz der Protease zu haben scheint. Zudem zeigt dieses Ergebnis, dass eine Degradation sowohl in der Fraktion stattgefunden hat, der Trypsin zugefügt wurde (Spur Nr. 4), als auch in der Probe, der keine Protease zusätzlich zugefügt wurde. Dieses spricht dafür, dass die endogenen Proteasen des Parasiten noch aktiv und während der Inkubationszeit die vorhandenen Proteine degradiert haben. Bestätigt wird dieses zudem durch die Betrachtung der PfHSP70 Detektion. Hier zeigt sich, dass nur in der ersten Spur das Protein zu finden ist, während nach 14 h keine Detektion mehr möglich war. Dieser Versuch lässt darauf schließen, dass eine *in vitro* Stabilisierung des Fusionsproteins durch die Zugabe eines Folat-Analogs wie z.B. Aminopterin möglich ist.

Um zu klären, ob endogene Proteasen zu einem Abbau der Proteine in den Fraktionen ohne AP geführt haben und zu verifizieren, dass die Stabilisierung des Fusionsproteins auch eine Resistenz gegenüber der Degradation durch parasiteneigene Proteasen vermittelt, wurde ein weiterer Protease-Protektions-Assay durchgeführt.

Wie oben beschrieben, wurden DG-Protein exprimierende Parasiten zunächst mittels Saponin von der Wirtszelle und der PV befreit und die lösliche Parasitenfraktion gewonnen. In diesem Versuch wurde diese Fraktion in acht Aliquote aufgeteilt. Vier Fraktionen wurden mit AP versetzt und vier Fraktionen erhielten ein äquivalentes

3. Ergebnisse

Volumen an DMSO. Jeweils zwei dieser Proben wurden erneut mit dem Enzym Trypsin versetzt, wobei zu jeweils einer zusätzlich ein Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) addiert wurde, um eine Degradation zu vermeiden. Dieses wurde zudem mit jeweils einer Probe der AP- bzw. DMSO-positiven Fraktion durchgeführt, denen zuvor kein Trypsin zugesetzt wurde. Erneut erfolgte eine Inkubation für 14 h bei 37°C. Durch Auftrennung mittels einer 12%igen SDS-PAGE, gefolgt von einem Western-Blot, wurden die Fraktionen erneut auf die Existenz der Proteine PfHSP70, sowie GFP hin untersucht. Zudem wurde überprüft, ob eine Detektion des mDHFR, als Teil des Fusionsproteins möglich ist.

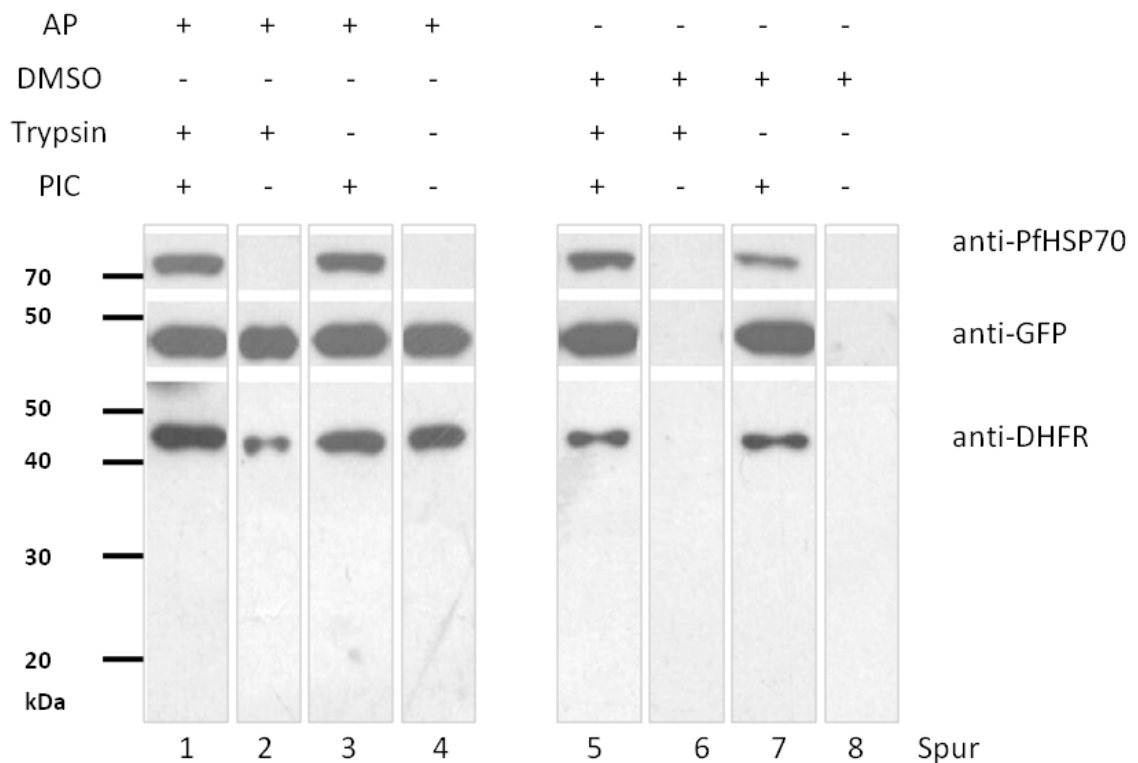


Abbildung 10: Protease-Protektions-Assay zum Test der endogenen Proteasen

Die lösliche Proteinfraction des Saponinpellets DHFR-GFP exprimierender Zellen wurde für 14 h bei 37°C in Anwesenheit (+) von AP (100µM), DMSO, Protease Inhibitor Cocktail (PIC) und Trypsin oder ohne die Zugabe dieser Substanzen (-) inkubiert. Zelläquivalente von 107 Zellen wurden durch SDS-Page und WB unter Verwendung von GFP-, DHFR und PfHSP70-Antikörper analysiert.

In der Abb.10 ist das Resultat des Versuchs gezeigt. Ähnlich wie in Abbildung 9 kann bei den Spuren 1-4, die die Fraktionen zeigen, bei denen AP als stabilisierendes Additiv hinzugefügt wurde, GFP in der Größe des vollständigen Fusionsproteins detektiert werden. Erneut deutet das auf eine erfolgreiche Stabilisierung hin. Die Detektion erfolgte zudem in den Fraktionen, bei denen PIC addiert wurde (Spur 5

und 7), blieb aber in den Spuren 6 und 8 aus. Dieses und die Verteilung des Markerproteins PfHSP70 weisen auf eine Degradation durch Trypsin bzw. endogene Proteasen hin. PfHSP70 kann nur in den Spuren nachgewiesen werden, in denen die Proben zuvor mit PIC versetzt wurden (Spuren 1,3,5 und 7). Die mDHFR Verteilung korrespondiert zu der Verteilung von GFP. Dass eine Stabilisierung des Fusionsproteins und damit einhergehende Resistenz gegenüber dem Abbau durch endogene Proteasen möglich ist, kann durch ein weiteres Detail bekräftigt werden. DHFR wird nur als Teil des vollständigen Fusionsproteins detektiert und nicht, wie das bei GFP der Fall war, auch als Degradationsfragment. Diese Beobachtung lässt auf eine vollständige Degradation des mDHFR-Anteil des Proteins schließen, die durch eine Stabilisierung durch AP verhindert wird, während GFP aufgrund seiner stabilen Struktur nur sehr langsam degradiert werden kann.

Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Fusionsprotein DG *in vitro* durch die Zugabe von einem Folat-Analog in seiner gefalteten Konformation stabilisiert werden kann und dadurch eine Resistenz gegenüber dem Abbau durch Proteasen erlangt.

3.1.4 Eine Stabilisierung des Fusionsproteins erfolgt auch durch die Zugabe des Folat-Analogs WR99210

Bei WR99210 handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Folat-Analog, welches die parasiteneigene Dihydrofolat Reduktase inhibiert, aber nicht an das humane DHFR binden kann. Dieses wird für eine positive Selektion von transfizierten Parasiten ausgenutzt. Die Expressionsplasmide enthalten ein Gen, welches für ein mutiertes humanes DHFR kodiert. Dieses verleiht Resistenz gegenüber WR99210 und transfizierte Parasiten nutzen dieses DHFR, um zu überleben. Hingegen sterben die Zellen, die kein Plasmid enthalten (Crabb und Cowman, 1996).

Bisher gab es keinen veröffentlichten Informationen darüber, ob WR99210 auch in der Lage ist, an das murine DHFR zu binden, welches als Teil des Fusionsproteins verwendet wurde. Die Überprüfung einer Stabilisierung durch WR war daher zwingend notwendig, um mögliche Falschaussagen zu vermeiden.

3. Ergebnisse

Für diesen Versuch wurde ein erneuter Protease-Protektions-Assay durchgeführt. Hierbei wurden die durch Saponinlyse gewonnenen Fraktionen in einem direkten Vergleich bezüglich ihrer Resistenz gegenüber einer Degradation mithilfe von AP und WR getestet. Die lösliche Fraktion wurde aliquotiert und je ein Ansatz mit WR99210 bzw. AP behandelt. Wie schon bei dem zuvor durchgeführten Assay (Abb. 10), wurden die Proben jeweils zur Hälfte mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt. In diesem Ansatz wurde auf die Zugabe von Trypsin verzichtet, da die bisher durchgeführten Experimente zeigten, dass die Degradation durch endogene Proteasen sehr effizient ist. Die Proben wurden erneut bei 37°C inkubiert, und konnten anschließend biochemisch, mittels SDS-PAGE, WB und Proteinnachweis durch AK-Inkubationen, gefolgt von einer ECL analysiert werden.

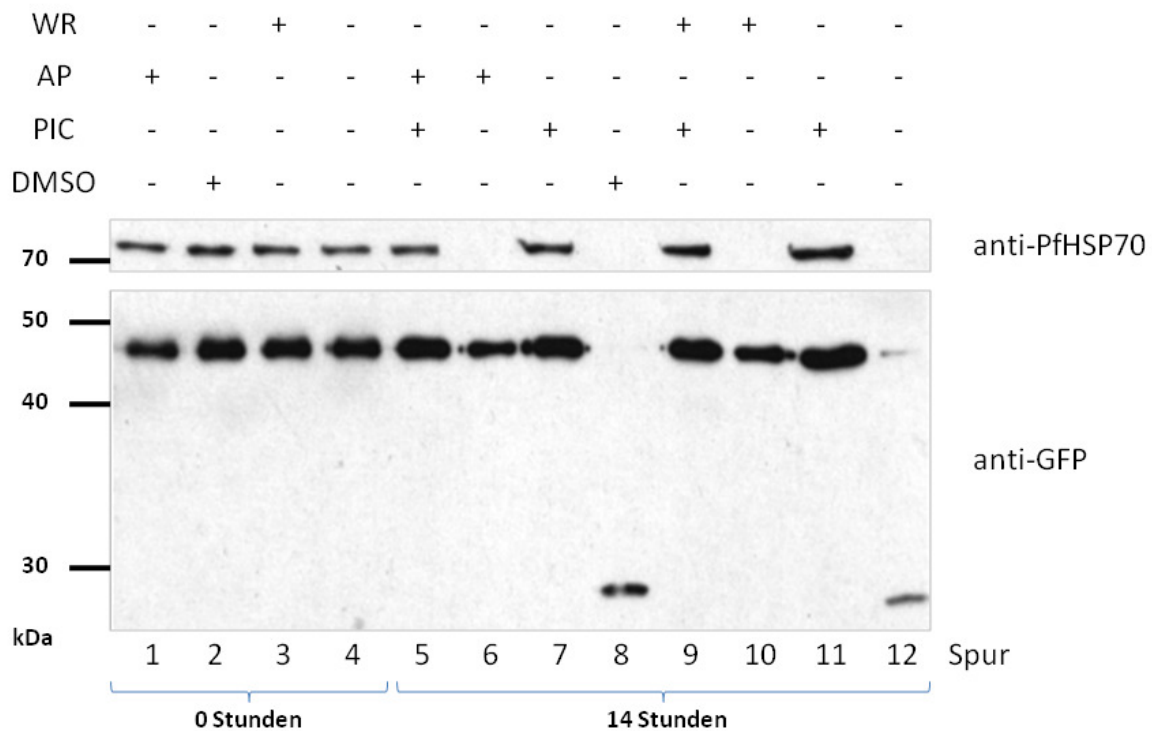


Abbildung 11: Protease-Protektions-Assay mit WR99210 (WR) und AP

Die löslichen Proteine der Pelletfraktion nach Saponinlyse DHFR-GFP exprimierender Zellen wurden für 0 h (Spuren 1-4) bzw. 14 h (Spuren 5-12) bei 37°C in Anwesenheit (+) von WR (100µM), AP (100µM), DMSO und Protease Inhibitor Cocktail (PIC) oder ohne die Zugabe dieser Substanzen (-) inkubiert. Zelläquivalente von 10^7 Zellen wurden durch SDS-PAGE und WB unter Verwendung von GFP- und PfHSP70-Antikörper analysiert.

Die ersten vier Spuren der Abb. 11 zeigen die Proben, die zu Beginn ($t=0$ h) entnommen wurden und als Positivkontrolle dienten. Wie zu sehen ist, kann für jeden Ansatz in etwa die gleiche Menge an Protein detektiert werden. Die Spuren 5 und 6 repräsentieren die Fraktionen, die für eine Inkubation mit AP verwendet wurden, während die Spuren 9 und 10 die Aliquote zeigen, die in Anwesenheit von WR99210 inkubiert wurden. Die Spuren 7 und 8 bzw. 11 und 12 stellen die jeweiligen Kontrollansätze dar, die ohne Zugabe von AP bzw. WR inkubiert wurden. Dass die endogenen Proteasen aktiv waren, zeigen die Spuren 6,8,10 und 12. In diesen Spuren kann kein *Plasmodium* spezifisches HSP70 mehr nachgewiesen werden. Auch ist nur noch das typische Proteasen-resistente GFP-Fragment in den Spuren 8 und 12 durch den anti-GFP Antikörper detektierbar. Das zeigt, dass die Fusionsproteine in Abwesenheit eines stabilisierendes Additivs dem Verdau durch Proteasen zugänglich ist. Vergleicht man das Bandenmuster des GFP-Fusionsproteins der Spuren 5 und 9, so zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis. So scheint eine Stabilisierung des DG-Proteins mit dem Folat-Analog WR99210 (Spur 9) nicht nur möglich zu sein, sondern auch in ihrer Stärke vergleichbar mit der Resistenz gegenüber dem Abbau von Proteasen, die durch AP vermittelt werden kann (Spur 5). Da die Verwendung des WR99210 bereits etabliert war, wurde für alle folgenden Versuche auf den Einsatz von Aminopterin verzichtet und WR99210 verwendet.

3.2 Untersuchung des Einflusses einer Stabilisierung zweier DHFR-Fusionsproteine auf den Transport *in vivo*

Mit Hilfe des Protease-Protektions-Assays konnte erfolgreich eine *in vitro*-Stabilisierung des DG-Fusionsproteins gezeigt werden. Nun wurde überprüft, ob auch eine Stabilisierung *in vivo* möglich ist und welche Konsequenzen sich, aufgrund einer Stabilisierung, hinsichtlich des Transports eines zu exportierenden Fusionsproteins ergeben.

3.2.1 Der Transport des Fusionsproteins, bestehend aus den ersten 80 AS von STEVOR, DHFR und GFP, wird durch eine Stabilisierung in der PV arretiert

Es konnte in vorangegangenen Studien bereits gezeigt werden, dass die ersten 80 AS von STEVOR ausreichend sind, ein Reporterprotein in das Zytoplasma des Erythrozyten zu transportieren (Przyborski *et al.*, 2005).

Um das Transportverhalten dieses Proteins im Kontext des DHFR-Fusionsprotein-System zu untersuchen, wurde ein Plasmid generiert, welches für die ersten 80 AS von STEVOR, gefolgt von der Sequenz für das mDHFR und GFP kodiert.

Die mit dem pARL^{SDG} transfizierten Parasiten wurden zunächst mikroskopisch analysiert. Um einen Einfluss des Transportverhaltens aufgrund einer Stabilisierung des DHFR innerhalb des Fusionsproteins zu untersuchen, wurden die Parasiten im Trophozoitenstadium geteilt und für einen Entwicklungszyklus (48 h) in Anwesenheit von 5 nM WR99210 bzw. ohne die Zugabe des Folat-Analogs weiterkultiviert. Die sich neu gebildeten Trophozoiten wurden im Anschluss mikroskopisch auf eine Verteilung des Fusionsproteins innerhalb der Zelle hin untersucht.

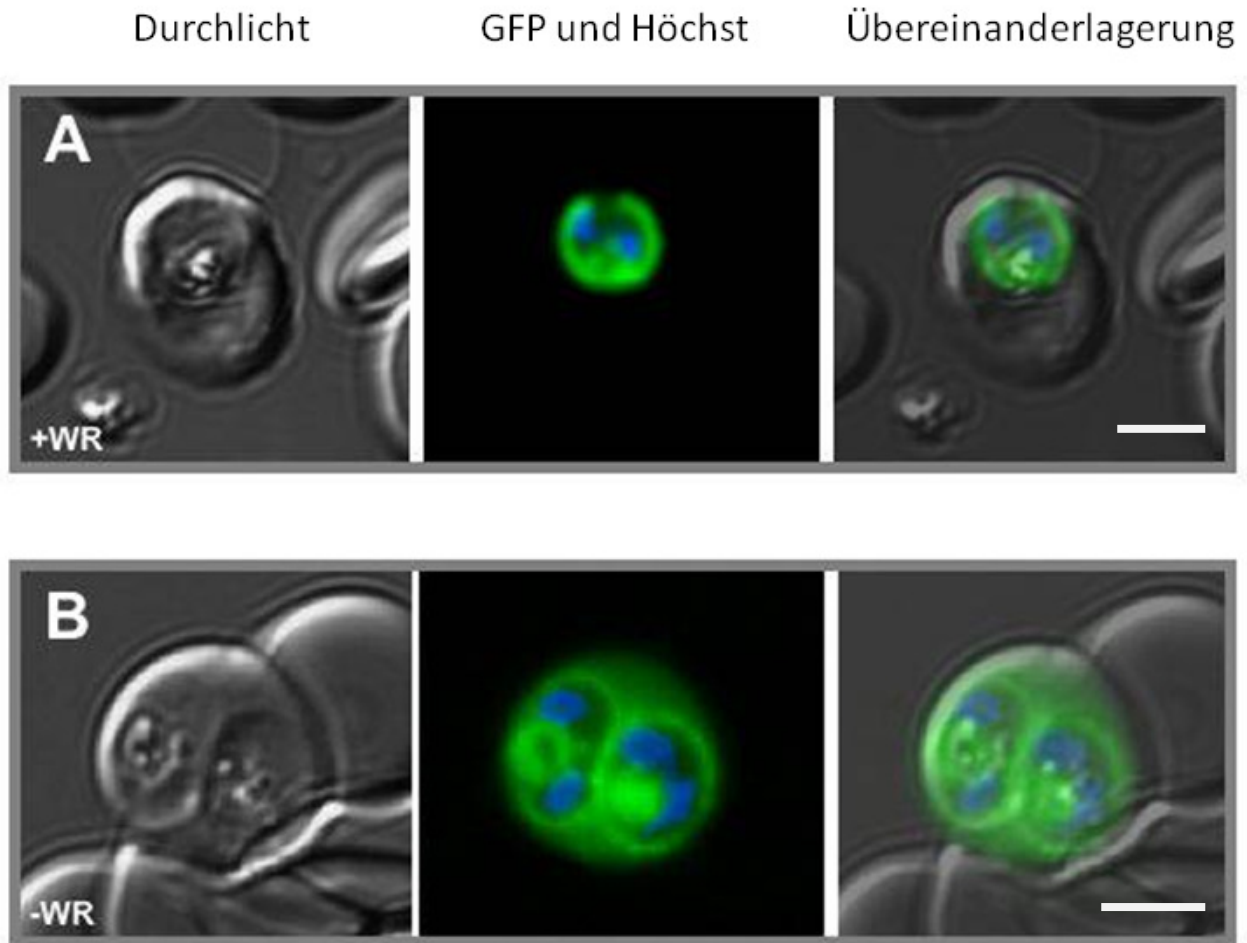


Abbildung 12: Mikroskopische Analyse der STEVOR-DHFR-GFP exprimierenden Zellen

Die Parasiten wurden mit (+WR) bzw. ohne die Zugabe (-WR) von 5 nM WR99210 kultiviert und anschließend wurde eine Lebendzell epifluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt. Der weiße Balken entspricht 3 µm.

Abb.12 zeigt die mikroskopische Analyse der SDG-exprimierenden Parasiten. Es wird deutlich, dass die Zugabe des stabilisierenden Agens einen offensichtlichen Einfluss auf die Verteilung des Fusionsproteins ausübt und kann als Indikator für eine erfolgreiche Stabilisierung des DHFR angesehen werden.

Parasiten, denen WR zugesetzt wurde, zeigen eine starke Fluoreszenz, die sich um den Trophozoiten herum konzentriert. Dieses deutet auf eine Lokalisierung innerhalb der parasitophoren Vakuole hin. Demgegenüber steht die Verteilung des SDG von Parasiten, die 48 h ohne WR kultiviert wurden. Hier kann eine deutliche Fluoreszenz des Reporters innerhalb des Zytoplasmas der Wirtszelle ausgemacht werden. Ein weiteres Indiz für den Export zeigt sich zudem durch die fluoreszierende Nahrungsvakuole, die aus der unspezifischen Aufnahme aus dem Zytosol resultiert.

Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass ein erfolgreicher Transport des Reporterproteins über die PVM nur erfolgen kann, wenn der DHFR-Anteil des Proteins nicht in seiner gefalteten Kornformation stabilisiert wurde.

Um diese mikroskopischen Beobachtungen biochemisch zu verifizieren, wurde eine zellfraktionierende Methode mit Streptolysin O (SLO) gewählt. SLO permeabilisiert unter geeigneten Bedingungen die Erythrozytenmembran und lässt die PV-, sowie die Parasitenplasmamembran intakt (Baumeister *et al.*, 2001). In dem Überstand befinden sich die löslichen Proteine der Wirtszelle, während die löslichen Proteine der PV und des Parasiten in der Pelletfraktion verbleiben. Nach mehrmaligem Waschen wurde die lösliche Fraktion des Pellets durch Tris-Lyse, gefolgt von dreimaligem Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff gewonnen. Alle Proben wurden zu gleichen Zelläquivalenten auf ein 12%iges SDS-Gel geladen. Nach einem Western-Blot und darauf folgendem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen, wurde der Blot auf eine Verteilung des Markerproteins SERP, sowie des Fusionsproteins durch einen GFP-Antikörper hin untersucht.

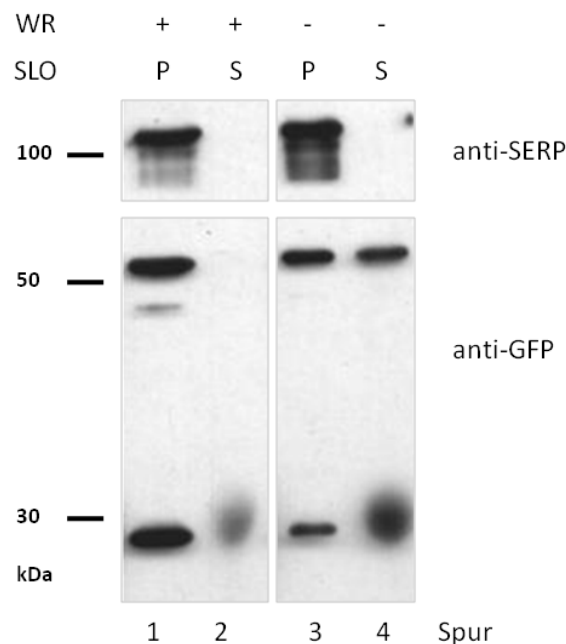


Abbildung 13: Streptolysin O (SLO) Fraktionierung mit SDG-exprimierenden Zellen infizierte RBZ

Durch SLO-Permeabilisierung gewonnene Überstand- (S) und Pellet- (P) Fraktion von Zellen, die mit (+) bzw. ohne (-) die Zugabe von WR99210 kultiviert wurden, wurden zu gleichen Zelläquivalenten auf ein 12%iges SDS-Gel geladen und durch einen Western-Blot mit den Antikörpern gegen GFP und SERP analysiert.

SERP wird als PV-residentes Protein als Marker verwendet, um eine mögliche Permeabilisierung der PV während der Behandlung durch SLO anzuzeigen (Ansorge *et al.*, 1996). Wie in Abb. 13 zu sehen ist, kann dieses Markerprotein nur in den Pelletfraktionen detektiert werden. Das zeigt, dass die PV intakt geblieben ist und lässt eine Bewertung der Verteilung der Fusionsproteine zu.

Das Fusionsprotein kann in den löslichen Überständen beider Pelletfraktionen detektiert werden (Spur 1 und 3). Bei genauer Betrachtung der ersten Spur ist eine stärkere Bande ersichtlich. Dabei handelt es sich um die Parasitenfraktion, die in Anwesenheit von WR kultiviert wurde. Auch kann in beiden Spuren ein proteolytisches Fragment detektiert werden, welches der Größe von GFP entspricht. Dieses könnte auf eine proteolytische Aktivität der Proteasen innerhalb der PV zurückzuführen sein.

Vergleicht man die Überstandfraktionen in den Spuren 2 und 4, so ist zu erkennen, dass das vollständige Fusionsprotein ausschließlich in der Spur Nr. 4 zu detektieren ist. Diese Überstandfraktion resultiert aus den Parasiten, die einen Zyklus ohne das stabilisierende WR99210 kultiviert wurden. Hingegen kann der GFP-Antikörper kein spezifisches Signal in der Überstandfraktion generieren, deren Parasiten zuvor mit WR kultiviert wurden (Spur 2). Sowohl in der löslichen Fraktion der WR-haltigen, als auch der Zellen ohne Zugabe von WR (Spur 2 und 4), kann bei etwa 25 kDa ein unspezifisches Signal detektiert werden, welches auf eine Reaktion des Chemilumineszenz-Reagenz mit Hämoglobin zurückgeführt werden kann (Ewetz und Thore, 1976).

Dieses Zellfraktionierungs-Experiment beweist den Transport des Fusionsproteins über die PVM in das Zytosol der Wirtszelle, die nur ohne Stabilisierung des SDG erfolgt und impliziert, dass sich lösliche Proteine in einer translokationskompetenten Konformation befinden müssen, damit der Export erfolgen kann.

3.2.2 Auch der Transport des Fusionsproteins, bestehend aus den ersten 150 AS von GBP130, DHFR und GFP, wird durch eine Stabilisierung in der PV arretiert

Wie bereits im Abschnitt 3.1.1 erwähnt, handelt es sich bei STEVOR um ein Transmembranprotein. Die ersten 80 AS dieses Proteins weisen keine Transmembrandomäne auf und auch konnte der Export eines Reporterproteins, bestehend aus dieser STEVOR-Sequenz und GFP, in das Zytoplasma des Erythrozyten nachgewiesen werden (Przyborski *et al.*, 2005). Allerdings kann die Möglichkeit nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass diese Sequenz eventuell Informationen aufweist, die einen Transport über einen anderen Sekretionsweg vermittelt, der sich von dem Transportweg löslicher Proteine unterscheidet. Daher wurde ein Plasmid generiert, das eine Sequenz für ein lösliches Protein enthielt. Da an dem GBP130 bereits Transportstudien durchgeführt wurden, verwendeten wir die ersten 150 AS dieses Proteins, zusammen mit DHFR und GFP. Daraus entstand das Fusionsprotein GDG. Nach erfolgreicher Transfektion wurden auch in diesem Fall zunächst mikroskopische Analysen durchgeführt, die einen Aufschluss über die Verteilung des Proteins geben sollten. Wiederum wurde eine Kultur von iRBZ geteilt, deren Parasiten sich im mittleren Trophozoitenstadium befanden und für 48 h mit bzw. ohne WR kultiviert. Im Anschluss wurden die Parasiten mit Hoechst 33258 behandelt und direkt mikroskopisch analysiert.

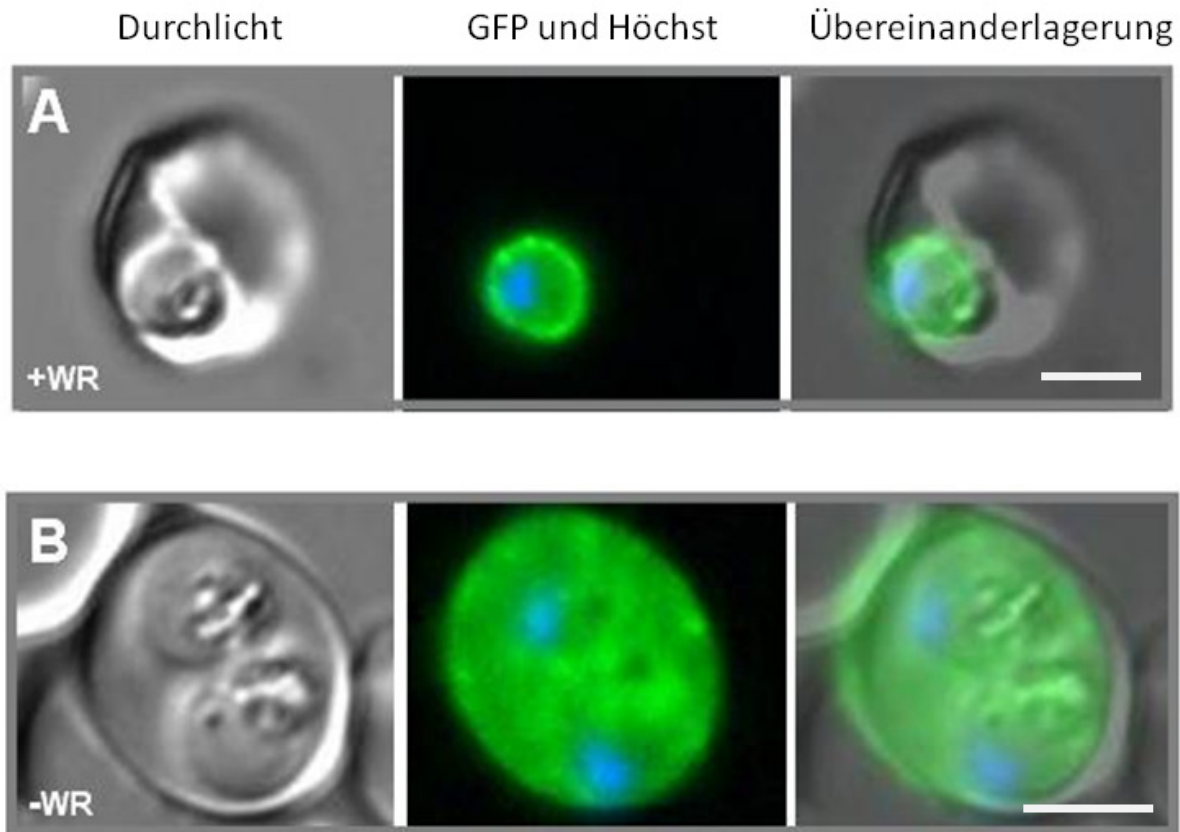


Abbildung 14: Mikroskopische Analyse der GBP130-DHFR-GFP exprimierenden Zellen

Die Parasiten wurden mit (+WR) bzw. ohne die Zugabe (-WR) von 5 nM WR99210 kultiviert und anschließend wurde eine Lebendzell epifluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt. Der weiße Balken entspricht 3 µm.

Die Abb.14 zeigt die Verteilung des fluoreszierenden GDG-Fusionsproteins, ähnlich wie sie auch schon bei dem SDG-Protein (Abb.12) zu beobachten war. Bei den WR positiven infizierten Zellen (A) ist eine deutliche Fluoreszenz um den Parasiten herum erkennbar, die auf eine Lokalisation innerhalb des Lumens der PV hinweist, während die WR negativen Zellen (B) eine eindeutige Fluoreszenz innerhalb der Wirtszelle aufzeigen. Auch in diesem Fall scheint ein Transport in das Zytoplasma des Erythrozyten nur zu erfolgen, wenn das GDG-Protein nicht in seiner gefalteten Kornform stabilisiert wurde und daher eine Entfaltung für eine Translokation möglich war. Um bei den Zellen, die unter Zugabe von WR99210 kultiviert wurden, die Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb der parasitophoren Vakuole eindeutig nachzuweisen, wurde eine Kolokalisation mit Hilfe eines Immunfluoreszenz-Assays durchgeführt (Tonkin *et al.*, 2004). Dabei wurden iRBZ zunächst fixiert und

anschließend permeabilisiert. Als Markerprotein wurde das PV-residente Protein PV1 nachgewiesen (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006).

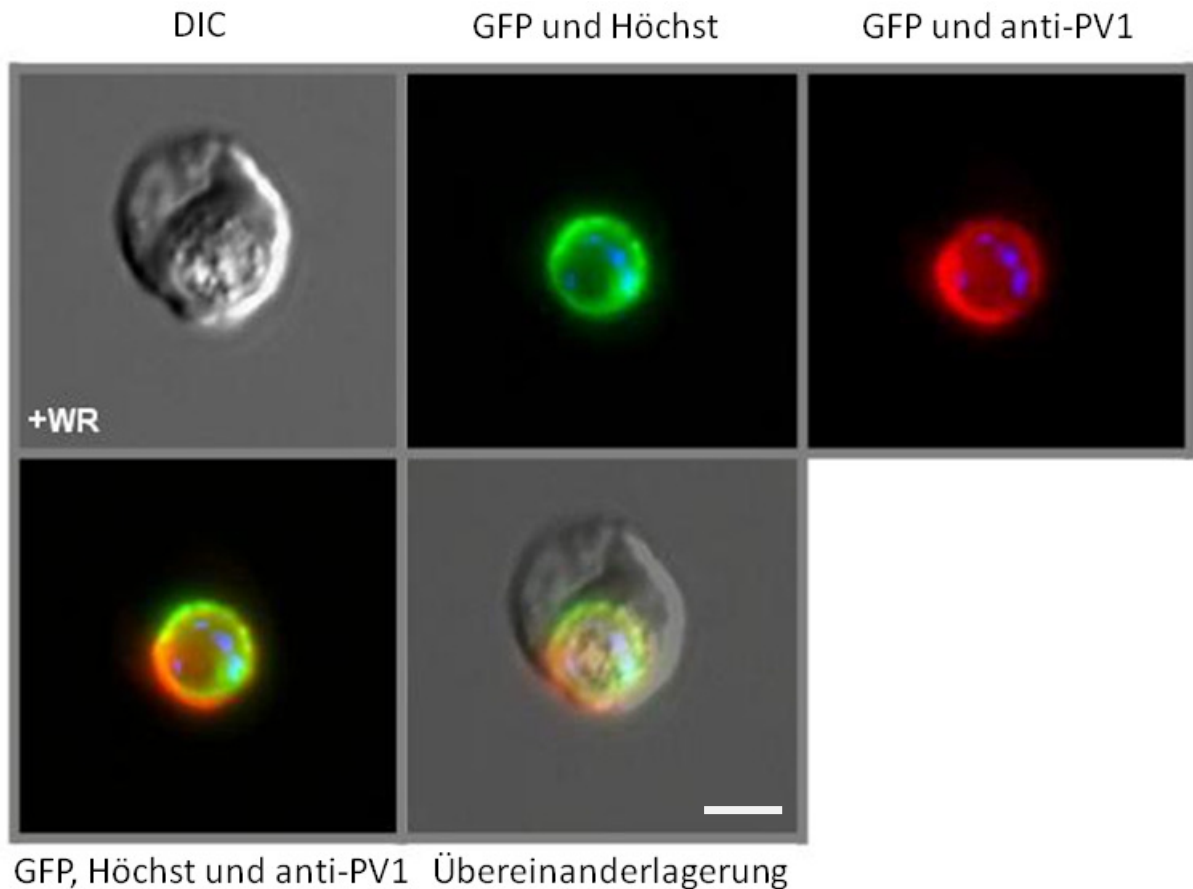


Abbildung 15: Kolokalisationsstudie durch ein Immunfluoreszenz-Assay mit anti-PV1

GDG-exprimierende Zellen wurden in Anwesenheit von WR99210 kultiviert und für die Durchführung des IFA fixiert. Die Kolokalisation wurde mit dem PV residenten PV1 durchgeführt. Die gelben Bereiche signalisieren eine deutliche Überlagerung des GFP (grün) mit dem anti-PV1 (rot). Der weiße Balken entspricht 3 µm.

Abb.15 zeigt die Lokalisation des GDG-Fusionsproteins (grün), sowie des Markerproteins PV1 (rot). Anhand des übereinandergelagerten Bildes ist eine Kolokalisation in großen Bereichen der PV eindeutig möglich und beweist damit die tatsächliche Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb des Lumens der PV. Dabei konzentriert sich die Fluoreszenz in einem Ring um den Parasiten herum. Eine Erweiterung an der Membranstruktur der PV, das auf die Existenz des sogenannten Tubovesikulären Netzwerks hindeuten würde, konnte nicht nachgewiesen werden.

Die auf diese Weise generierten mikroskopischen Daten wurden zusätzlich durch biochemische Experimente verifiziert. Wie bereits für das SDG-Protein, wurde auch für die GDG exprimierenden Parasiten eine Zellfraktionierung mit dem porenformenden Toxin SLO durchgeführt. Eine Kultur wurde dafür für einen Zyklus

(48 h) ohne das stabilisierende Folat-Analog kultiviert, während einer zweiten Kultur WR99210 zugeführt wurde. Nach Anreicherung der infizierten Zellen durch Gelafundin, wurden die Zellen mit SLO behandelt. Erneut wurden gleiche Zelläquivalente, sowohl vom erhaltenen SLO-Überstand, als auch von der löslichen Fraktion des SLO-Pellets auf ein 12 prozentiges SDS-Gel geladen, und nach WB und Antikörper-Inkubationen erfolgte eine Visualisierung der Verteilung der Proteine mittels ECL.

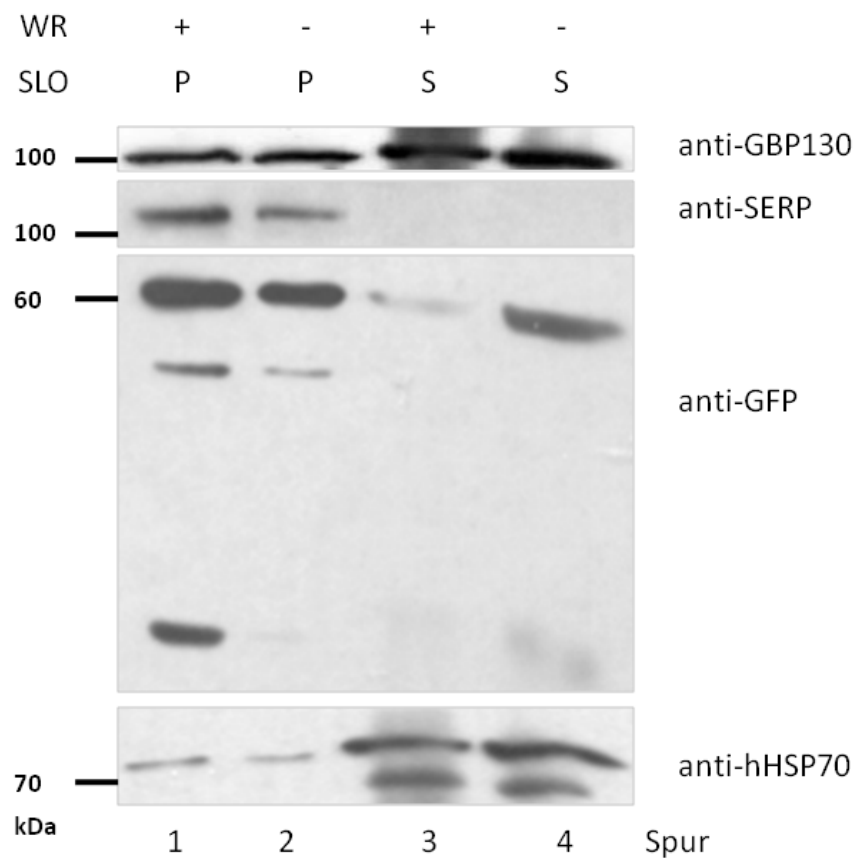


Abbildung 16: Streptolysin O (SLO) Fraktionierung mit GDG-exprimierenden Zellen infizierte RBZ

Durch SLO-Permeabilisierung gewonnene Überstand- (S) und Pellet- (P) Fraktionen von Zellen, die mit (+) bzw. ohne (-) die Zugabe von WR99210 kultiviert wurden, wurden zu gleichen Zelläquivalenten auf ein SDS-Gel geladen und durch einen Western-Blot mit den Antikörpern gegen GBP130, humanes HSP70, PfAldolase, GFP und SERP analysiert.

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, können die zuvor durchgeführten mikroskopischen Analysen durch Zellfraktionierung bestätigt werden. Dieses Ergebnis korreliert zudem mit der Abb. 13, die die Verteilung des SGD-Fusionsproteins darstellt. Zellen, die in Anwesenheit von WR kultiviert wurden, zeigen nach der Zellfraktionierung durch SLO

eindeutig, dass sich das Fusionsprotein in der Pelletfraktion detektieren lässt (Spur 1), während die Zellen ohne Zugabe von WR einen klaren GFP-Nachweis in der SLO-Überstandfraktion (Spur 4) zulassen, was auf die Existenz des vollständigen Fusionsproteins in dem Wirtszellzytoplasma des Erythrozyten hinweist. Als Kontrolle, dass die PV während der SLO-Permeabilisierung intakt geblieben ist, wurde SERP nachgewiesen. Tatsächlich kann SERP nur in den Pelletfraktionen nachgewiesen werden (Spuren 1 und 2) und macht dieses Experiment daher auswertbar. Als Ladungskontrolle, dass äquivalente Mengen verwendet wurden, diente der Nachweis des humanen HSP70. Tatsächlich kann sowohl in den Fraktionen von WR+, wie auch denen von WR- ein gleicher Teil an hsHSP70 detektiert werden. Um zu überprüfen, dass das stabilisierte Fusionsprotein keine negativen Effekte auf andere zu exportierende Proteine ausübt, wurde zudem die Verteilung der parasiteneigenen GBP130 untersucht. Dieses Protein kann sowohl in den Pellet- wie auch den Überstandfraktionen detektiert werden. Auch ist die Intensität der GBP130-Banden beider Überstände vergleichbar (Spuren 3 und 4). Das entspricht der Verteilung, wie sie bereits zuvor beschrieben wurde (Ansorge *et al.*, 1996). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Stabilisierung keine negativen Effekte auf eine Translokation endogener Proteine über die PVM hat.

3.3 Die Stabilisierung des Fusionsproteins ist abhängig von der Konzentration des eingesetzten Folat-Analogs

Die bisher erzielten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass durch die Zugabe eines Folat-Analogs, wie z.B. WR99210, eine Stabilisierung des Fusionsproteins erfolgt, aufgrund derer eine Translokation über die Membran der parasitophoren Vakuole inhibiert wird. Jedoch konnte die Möglichkeit, dass andere Mechanismen als eine Stabilisierung zu einer Blockierung des Transportweges führen, noch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Um dies auszuschließen, wurden Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an WR kultiviert. Die Arbeitshypothese, die diesem Versuch vorausging besagte, dass, falls der Transport durch die Stabilisierung des Fusionsproteins zustande kam, man in der Lage sein sollte, intermediäre Zustände der Transportinhibition sehen zu können. Aus diesem Grund

3. Ergebnisse

wurden transfizierte Zellen, die das GDG-Protein exprimierten, in 5 Ansätze unterteilt. Jede Kultur erhielt dabei für einen Zeitraum über 48 h, angefangen bei 0 nM WR, eine andere Konzentration an WR. Die Zellen wurden im Anschluss mikroskopisch analysiert, um die Verteilung des fluoreszierenden Proteins zu beobachten.

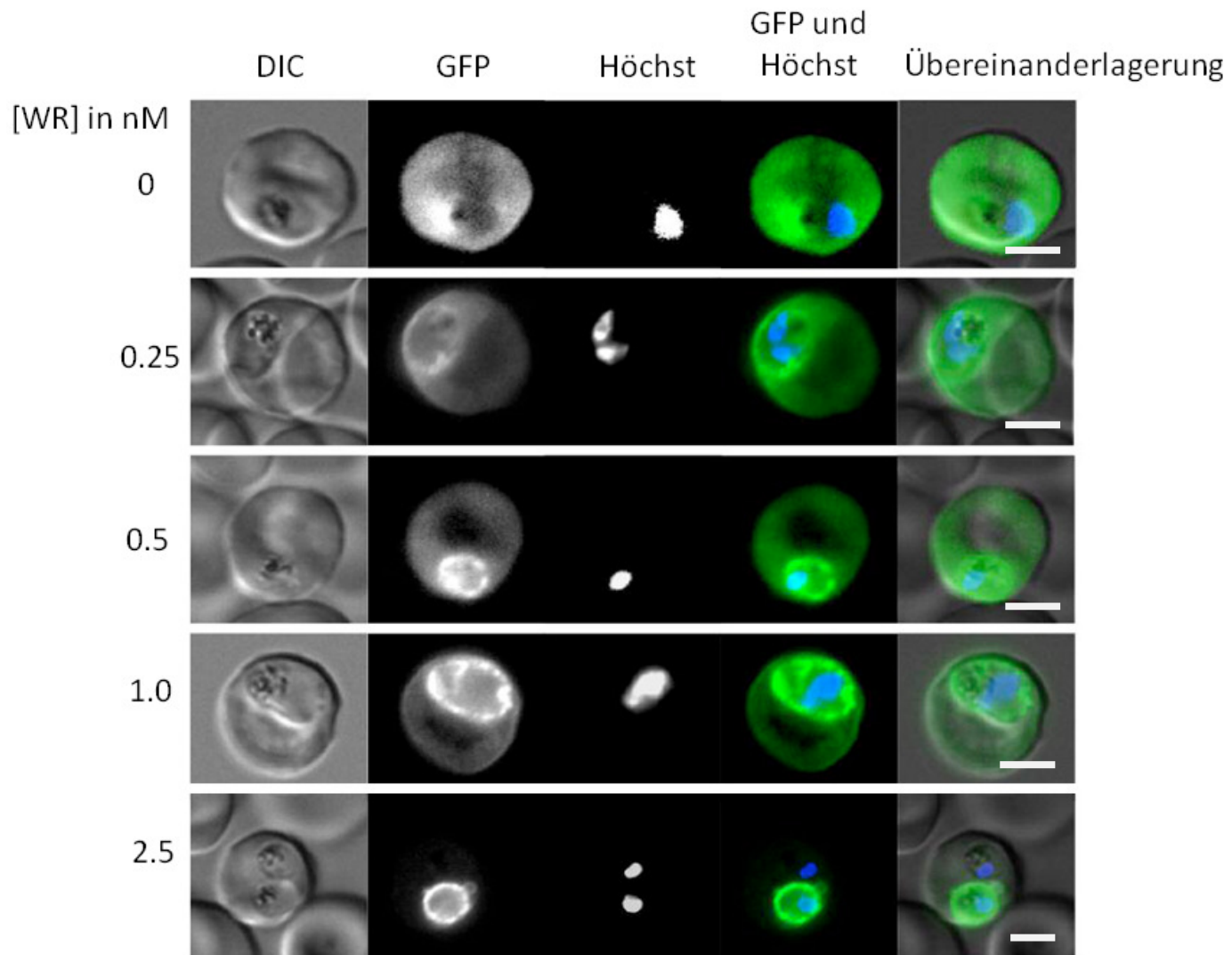


Abbildung 17: Einfluss der WR-Konzentration auf die Translokationseffizienz des GDG-Fusionsproteins

iRBZ wurden für 48h mit unterschiedlichen Konzentrationen an WR99210 kultiviert und anschließend mikroskopisch analysiert. Der weiße Balken entspricht 3 µm.

Abb.17 zeigt das Ergebnis der mikroskopischen Analyse der Konzentrationsstudie. Wie bereits in Abb.14 zu sehen war, ist in den WR negativen Zellen eine starke Fluoreszenz im Zytoplasma der Wirtszellen zu beobachten (0 nM WR). Jedoch kann bereits ab einer Konzentration von 0.5 nM WR eine schwache Fluoreszenz innerhalb

einer Ringstruktur um den Parasiten ausgemacht werden, bei der es sich wahrscheinlich um die PV handelt. Diese Ansammlung an GDG-Protein wird noch deutlicher bei einer Verdopplung der WR-Konzentration (1 nM WR). Fast keine Fluoreszenz außerhalb der PV ist ab einer Zugabe von 2.5 nM WR detektierbar und verschwindet vollkommen ab 5 nM (Abb.14). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Stabilisierung und damit einhergehende Inhibierung der Translokation abhängig ist von der verwendeten Menge an stabilisierendem Agens.

3.4 Das Fusionsprotein bildet in der Anwesenheit von WR keine Aggregate und verhält sich wie ein lösliches Protein

Als eine weitere mögliche Ursache einer Arretierung der Fusionsproteine während des Transportweges innerhalb der parasitophoren Vakuole könnte eine Aggregatbildung der Proteine in Frage kommen. Gründe dafür könnten z.B. eine falsche Faltung oder auch die Bindung des Folat-Analogs sein, die zu einer Proteinaggregation und Ausfällung des Proteins führen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde das SDG-Fusionsprotein auf seine Löslichkeit hin untersucht. Dafür wurde eine Kultur im Trophozoitenstadium geteilt, eine wurde mit WR99210 kultiviert, die andere Hälfte erhielt für eine Zeitspanne von 48 h kein WR. Im Anschluss wurde der lösliche Überstand beider Parasiten-Kulturen durch Saponin-Lyse extrahiert. Dieser Überstand beinhaltet sowohl die Proteine des Erythrozytenzytosol, wie auch der PV. Diese Ansätzen wurden erneut geteilt, mit jeweils einem Aliquot wurde eine Zentrifugation bei 30.000 rpm für 1 h durchgeführt, die zweite Probe wurde für eine Ultrazentrifugation bei 100.000 rpm für 1 h verwendet. Die erhaltenen Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem WB mit dem GFP-Antikörper inkubiert, der durch ECL visualisiert wurde.

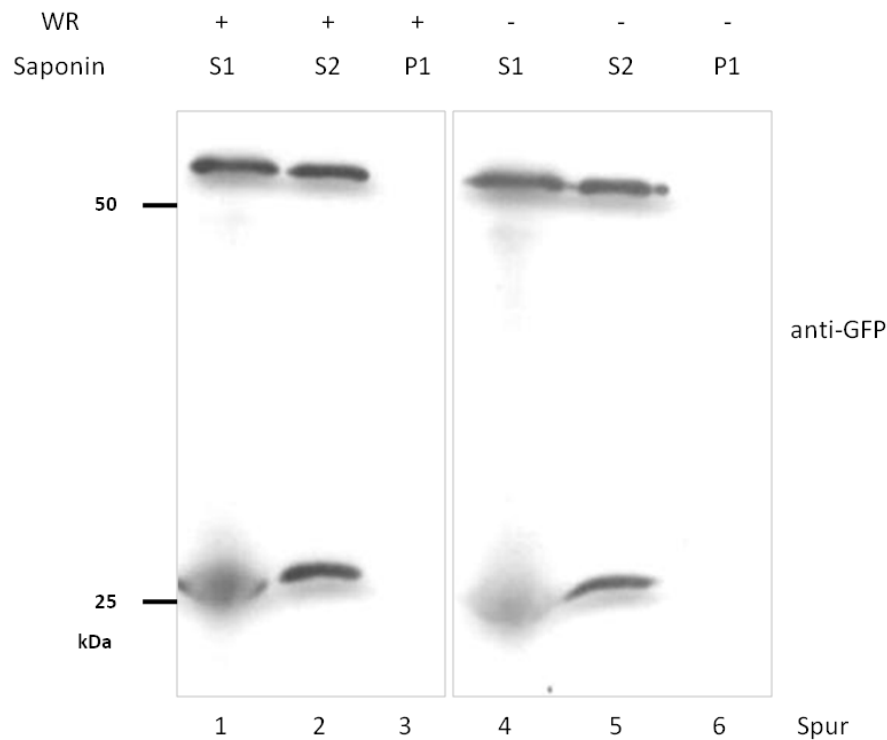


Abbildung 18: Untersuchung der Löslichkeit der SDG-Fusionsproteine mit Hilfe von Ultrazentrifugation

Die Überstandfraktion von Zellen nach Saponinlyse, die mit (+) bzw. ohne (-) WR99210 für 48h kultiviert wurden, wurde geteilt und für 1h bei 30.000 (S1) bzw. 100.000 rpm (S2) zentrifugiert. Die erhaltene Pelletfraktion aus der Ultrazentrifugation (P1) wurde geladen, um eine Aggregatbildung zu überprüfen. Pro Spur wurden gleiche Zelläquivalente von 1×10^7 Zellen aufgetragen.

Ein Vergleich der Bandenintensität der Spuren von den WR positiven Zellen (Spuren 1-3) mit denen von den WR negativen Zellen (Spuren 4-6), zeigt eine vergleichbare Menge an Protein in den Spuren. Auch ergibt sich kein Unterschied in der Verteilung der Proteine, die bei 30.000 rpm (S1) bzw. 100.000 rpm (S2) zentrifugiert wurden. Die Fusionsproteine verhalten sich in beiden Fällen löslich, da keine Detektion in der erhaltenen Pelletfraktion (P1) nach der Ultrazentrifugation möglich ist (Spuren 3 bzw. 6). Dieses Ergebnis führt zu dem Schluss, dass sich weder bei der Stabilisierung durch WR, noch aufgrund einer Überexpression des Fusionsproteins Aggregate bilden. Unter den getesteten Bedingungen konnte gezeigt werden, dass diese Proteine löslich sind.

3.5 Die Arretierung ist keine Folge einer Überexpression des Fusionsproteins

Da nun ausgeschlossen werden konnte, dass die Arretierung des Transports in der PV eine Folge einer Aggregatbildung des Fusionsproteins war, bestand jedoch noch die Möglichkeit, dass eine Überexpression die Inhibition der Translokation bewirkte. Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 kurz angesprochen, ermöglicht WR99210 bei dem, in unserem Labor verwendeten, Plasmid pARL2+, die positive Selektion transfizierter Zellen. Da es sich dabei um eine episomale stabile Transfektion handelt, muss die Zugabe dieses Folat-Analogs konstant aufrechterhalten werden (Crabb *et al.*, 1997). So führt bereits ein Zeitraum von 96 h zu einer drastisch reduzierten Expression der Fusionsproteine. Im Gegenzug besteht die Möglichkeit, dass eine tägliche Addition von WR zu einer Überexpression führt, die eventuell auch einen negativen Einfluss auf die Effizienz der Translokation ausüben könnte. Aus diesem Grund wurde das Plasmid pARL^{GG} generiert. Dieses weist die Sequenzen für die kodierenden Bereiche der ersten 150 AS von GBP130 und GFP auf, verfügt jedoch über keine DHFR-Sequenz. Sollte ein erhöhtes Level der Expression zu einer Inhibition der Translokation führen, könnte man erwarten, dass dieses Protein unter Zugabe von WR in der PV lokalisiert ist, obwohl keine Stabilisierung durch WR99210 stattfinden kann.

Nach erfolgreicher Selektion der transfizierten Parasiten mit pARL^{GG}, wurden die Parasiten wie bereits zuvor beschrieben, geteilt und einmal mit bzw. ohne die Zugabe von WR99210 über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Diese Zellen wurden im Anschluss mikroskopisch analysiert.

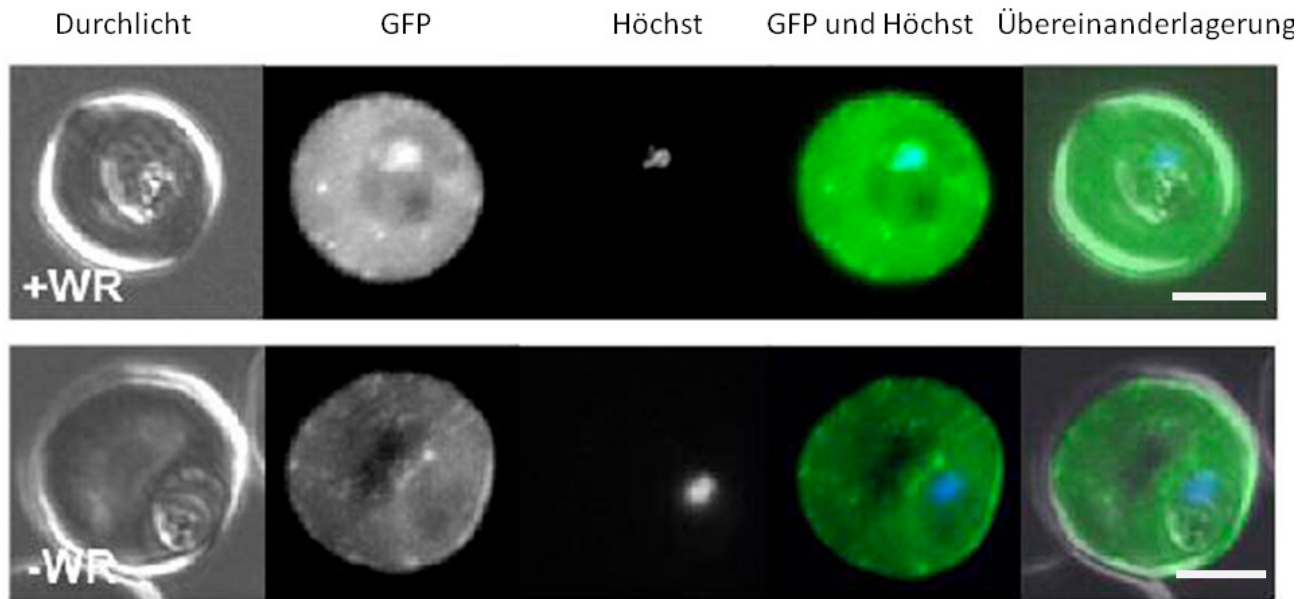


Abbildung 19: Mikroskopische Analyse der GBP130-GFP exprimierenden Zellen

Die Parasiten wurden mit (+WR) bzw. ohne die Zugabe (-WR) von 5 nM WR99210 kultiviert und anschließend wurde eine mikroskopische Analyse mit lebenden Zellen durchgeführt. Der weiße Balken entspricht 3 μ m.

Vergleicht man in Abb.19 die WR negativen mit der WR positiven Zellen, so ist eindeutig festzustellen, dass eine mögliche Überexpression, als Folge der Zugabe von WR, keinen Einfluss auf die Lokalisation des GG-Fusionsproteins zu haben scheint. In beiden Fällen können die fluoreszierenden Proteine eindeutig in dem Zytoplasma der Wirtszelle detektiert werden. Dieses deutet darauf hin, dass nur durch die Bindung und Stabilisierung des WR an den DHFR-Anteil des Fusionsproteins eine Arretierung des Transports innerhalb der PV vermittelt.

Diese mikroskopischen Beobachtungen konnten auch mittels biochemischer Zellfraktionierungen durch SLO bestätigt werden.

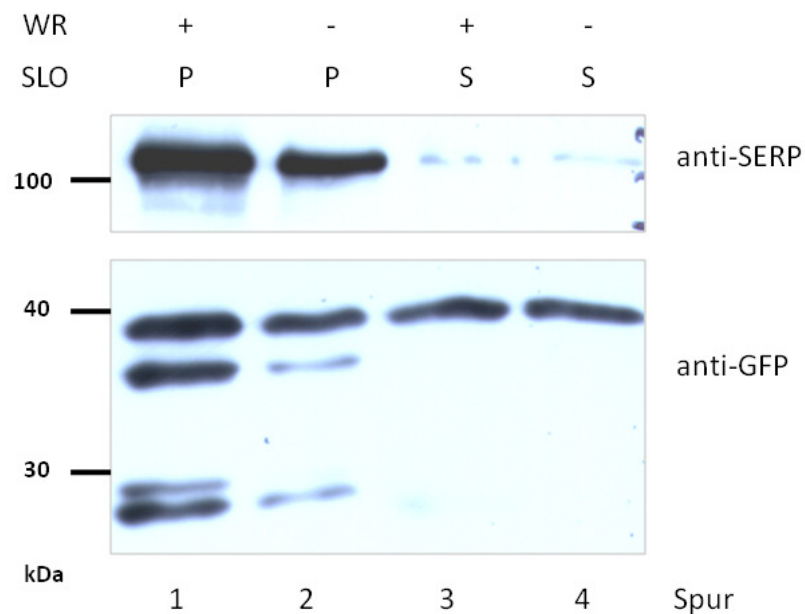


Abbildung 20: Streptolysin O (SLO) Fraktionierung mit GG-exprimierenden Parasiten infizierter RBZ

Durch SLO-Permeabilisierung gewonnene Überstand- (S) und Pellet- (P) Fraktion von Zellen, die mit (+) bzw. ohne (-) die Zugabe von WR99210 kultiviert wurden, wurden zu gleichen Zelläquivalenten auf ein SDS-Gel geladen. Nach einem Western-Blot wurde dieser sowohl mit den Antikörpern gegen GFP als auch SERP analysiert.

Wie in Abb.20 zu erkennen ist, kann in beiden SLO-Überstandfraktionen eine signifikante Menge an vollständigem GG-Fusionsprotein detektiert werden (Spuren 3 und 4). Auch das als PV-residentes Markerprotein verwendete SERP ist fast ausschließlich in den Pelletfraktionen nachzuweisen. Das zeigt, dass während der SLO-Permeabilisierung der überwiegende Teil der PV-Membran intakt geblieben ist. Auffallend ist auch eine deutliche Detektion vollständiger, sowie unterschiedlich stark degradierter Fusionsproteine in den SLO-Pelletfraktionen (Spuren 1 und 2). Mikroskopisch kann keine definitive Aussage über eine Fluoreszenz innerhalb des Parasiten gemacht werden. Das Ergebnis der Zellfraktionierung deutet jedoch auf eine Existenz des GG-Proteins in dem Parasiten bzw. innerhalb der PV hin. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich diese Proteine auf dem Transportweg befinden, jedoch (noch) keine funktionstüchtige Chromophore ausgebildet haben. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Blockierung des Transportweges über die parasitophoren Vakuolenmembran nicht auf eine Überexpression des Fusionsproteins zurückzuführen ist und bestärkt ein erneutes

Mal, dass eine Translokation der löslichen Fusionsproteine nur erfolgen kann, wenn diese sich in einem translokationskompetenten Zustand befinden.

3.6 Bei der *in vitro*-Stabilisierung des DHFR-Anteils durch WR99210 handelt es sich um einen reversiblen und dynamischen Prozess

Um den Prozess der Stabilisierung durch die Bindung des Folat-Analogs an DHFR genauer zu charakterisieren, wurde ein *in vitro*-Assay mit Parasiten, die das Fusionsprotein SDG exprimierten, durchgeführt. Dafür wurden die löslichen Proteine der Pelletfraktion nach einer SLO-Permeabilisierung verwendet, die aus einer WR-haltigen Zellkultur extrahiert wurden. Diese Fraktion wurde ohne die Zugabe von WR99210 und einem Protease-Inhibitor-Cocktail bei 37°C inkubiert, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für eine Analyse entnommen wurden. Wie bereits zu Anfang in Abschnitt 3.1.4, Abb.11 gezeigt werden konnte, sind die endogenen Proteasen unter diesen Bedingungen in der Lage, Proteine zu degradieren. Ausgehend von dieser Tatsache, sollte ein Abbau des Fusionsproteins darüber Aufschluss geben können, wie stark und nachhaltig die Bindung und Stabilisierung des WR99210 an den DHFR-Anteil des Fusionsproteins ist.

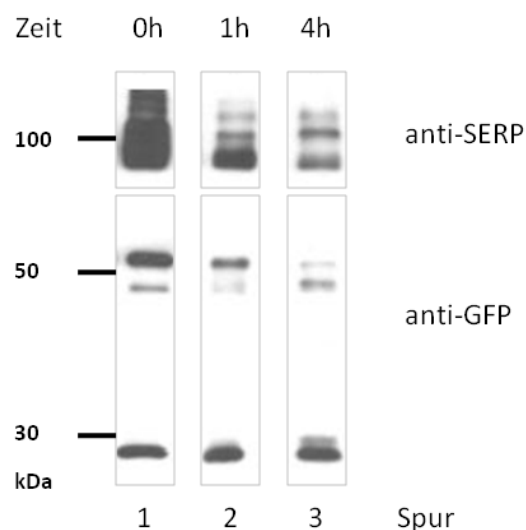


Abbildung 21: *In vitro*-Stabilitätsstudie des DHFR-WR-Komplexes mit SDG-Proteinextrakten

Lösliche Proteine der Pelletfraktion von SDG exprimierenden Zellen nach einer SLO-Permeabilisierung, die mit WR99210 kultiviert wurden, wurden für verschiedene Zeiten bei 37°C ohne WR inkubiert und anhand eines WB durch die Detektion von GFP und SERP analysiert.

Abb. 21 zeigt die *in vitro* Degradation des SDG-Fusionsproteins. Als Kontrolle für die Aktivität der endogenen Proteasen wurde das PV-residente Protein SERP detektiert. Man kann deutlich erkennen, dass SERP innerhalb von vier Stunden stark degradiert wurde. Die erste Spur zeigt die Probe, die vor Beginn der Inkubation entnommen wurde. Das vollständige Fusionsprotein ist bei etwa 51 kDa zu detektieren. Auch ein kleineres Degradationsprodukt, welches der Masse von DHFR und GFP entspricht, kann nachgewiesen werden, sowie das bereits zuvor erwähnte etwa 27 kDa große GFP-Fragment. Bereits nach einer Stunde bei 37°C kann eine Verringerung des SDG-Proteins beobachtet werden, was für einen bereits fortgeschrittenen Abbau spricht und darauf hinweist, dass ein signifikanter Teil des DHFR nicht mehr durch WR99210 stabilisiert wird. Nach vier Stunden (Spur 3) ist das vollständige Protein nur noch sehr gering nachzuweisen und auch die Bandenintensität des kleineren Fragments bei etwa 49 kDa ist deutlich verringert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bindung des DHFR durch WR99210 reversibel zu sein scheint und *in vitro* bereits nach einer Stunde stark nachgelassen hat. Natürlich ist in diesem Zusammenhang auch zu beachten, dass die Bindung auch aufgrund der Proteasen unterbrochen werden konnte, die eventuell zu einem Abbau des WR99210 geführt haben. Da WR99210 in dieser Studie nicht extern zugefügt und im Überschuss vorlag, steht das jedoch nicht im Widerspruch zu dem Protease-Protektions-Assay, welches eine tatsächliche Bindung eines Folat-Analogs an DHFR und die Stabilisierung bewiesen hat.

Da dieses Resultat auf eine reversible Bindung hindeutet, stellte sich die Frage, ob es auch *in vivo* möglich sein könnte, den Transport nachzuvollziehen. Dafür wurden infizierte Zellen, deren Parasiten das GDG-Fusionsprotein exprimierten, zunächst für einen Zyklus (48 h) in zwei Kulturen geteilt, wobei eine mit bzw. ohne die Zugabe von WR kultiviert wurden. Beide Kulturen wurden danach erneut geteilt; der einen Hälfte der WR positiven Kultur wurde für sechs Stunden kein WR hinzugefügt (+/-), die andere Hälfte wurde weiterhin in WR komplettiertem Medium gehalten (+/+). Das Analoge erfolgte mit der Kultur, die zuvor ohne WR kultiviert wurde. Einer Hälfte wurde WR zugegeben (-/+), die andere Hälfte weiterhin ohne kultiviert (-/-). Diese vier Kulturen wurden nach Ablauf der sechs Stunden mikroskopisch untersucht.

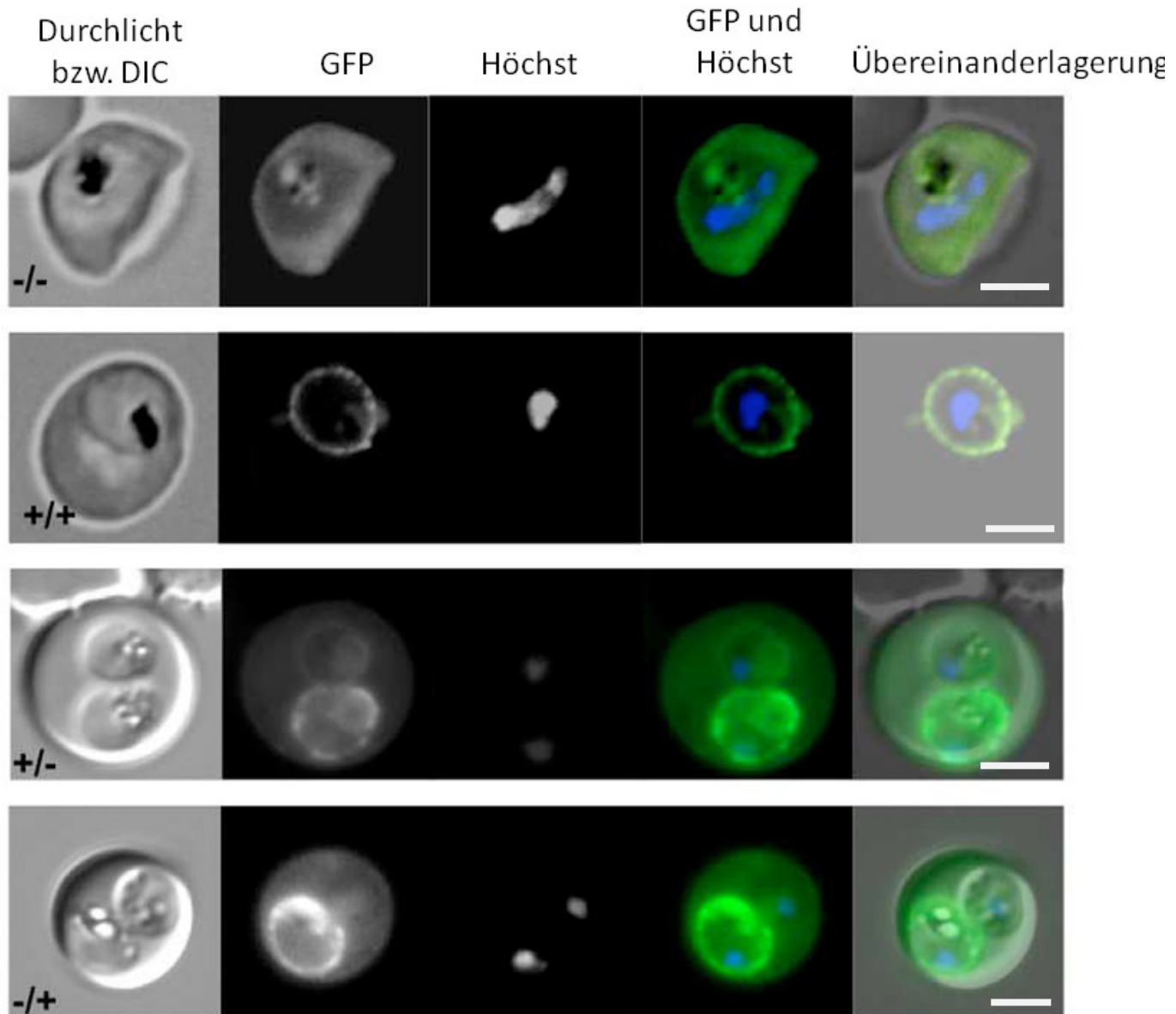


Abbildung 22: *In vivo* Stabilitätsstudie des DHFR-WR-Komplexes mit GDG-exprimierenden Zellen

Infizierte RBZ wurden für 48h mit (+) bzw. ohne WR99210 (-) kultiviert, geteilt und jeweils für weitere 6h unter Zugabe (+/+, -/+) oder ohne Addition von WR (+/-, -/-) in Kultur gebracht. Im Anschluss wurden die Zellen mikroskopisch analysiert. Der weiße Balken entspricht 3 µm.

Abb. 22 zeigt die mikroskopischen Analysen dieses Experiments. Wie bereits bei Abb. 14 erkennbar war, zeigen die Zellen, die permanent mit WR kultiviert wurden (+/+), eine charakteristische ringförmige Fluoreszenzverteilung um den Parasiten herum, bei der es sich um die PV handelt. Im Gegenzug dazu ist bei der Kultur, der kein WR zugefügt wurde (-/-), eine starke Fluoreszenz im Zytoplasma des Erythrozyten zu beobachten. Hier konnte eine Translokation des Fusionsproteins erfolgen. Bei den +/-, sowie bei den -/+ Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild, welches

als Intermediärstatus bezeichnet werden könnte. Die zuvor WR-positiven Zellen (+/-) lassen nach sechs Stunden ohne die Zugabe des stabilisierenden Agens eine deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma erkennen, was für den Transport des Proteins über die PVM spricht. Demgegenüber kann bei den ehemals WR negativen Zellen (-/+) nach sechs Stunden unter dem Einfluss von WR99210 eine Fluoreszenz innerhalb der PV detektiert werden, die für eine Blockierung des Transports über die PV spricht.

Dieses Resultat zeigt, dass bereits nach wenigen Stunden ein Unterschied der Lokalisation der Fusionsproteine beobachtet werden kann und kein vollständiger Zyklus durchlaufen werden muss.

3.7 Nur neu synthetisierte Proteine können über die Membran der parasitophoren Vakuole transloziert werden

Die in Abb. 21 und 22 gezeigten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Prozess der Stabilisierung reversibel ist, wobei eine Neuverteilung nach sechs Stunden beobachtet werden kann. Allerdings konnte in weiteren durchgeführten Experimenten, in denen frühere Zeitpunkte gewählt wurden kein optisch detektierbarer Nachweis gelingen (Daten nicht gezeigt). Die mikroskopische Neuverteilung der Proteine war erst nach ca. sechs Stunden sichtbar. Dieses Ergebnis ließ die Vermutung zu, dass Proteine, wenn sie einmal vollständig gefaltet waren, nicht mehr über die PVM transloziert und tatsächlich nur neu synthetisierte transportiert werden können. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde das in Abb. 16 gezeigte Experiment wiederholt, dieses Mal unter dem Einfluss des Pilz-Metaboliten Brefeldin A (BFA), der den Proteintransport zwischen ER und Golgi inhibiert (Abschnitt 1.2.2) (Robineau *et al.*, 2000, Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989). Infizierte Erythrozyten, deren Parasiten das Fusionsprotein GDG exprimieren und unter Zugabe von WR kultiviert wurden, wurden dreimal in WR freiem Medium gewaschen und für sechs Stunden unter verschiedenen Bedingungen erneut in Kultur gebracht. Einmal mit WR und BFA in einer Konzentration von 5 µg/ml, einmal mit BFA und ohne WR, und als Negativkontrolle wurde eine Kultur weder mit BFA noch mit WR

3. Ergebnisse

versetzt. Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mikroskopisch analysiert.

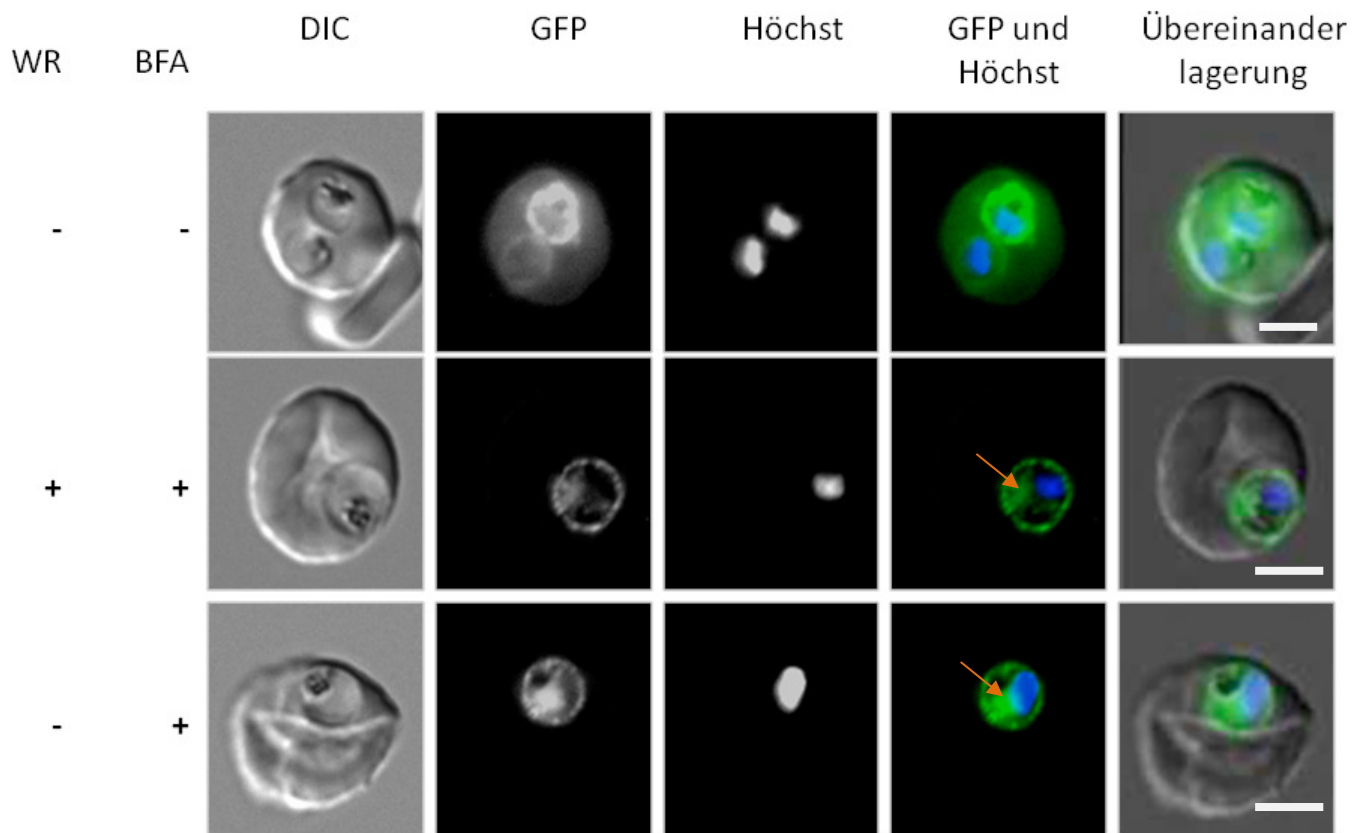


Abbildung 23: Der Einfluss von BFA auf den Transport des GDG-Fusionsproteins in infizierten Erythrozyten

Infizierte Erythrozyten, die unter Zugabe von WR kultiviert wurden, wurden für 6 h mit 5nM WR99210 und /oder mit 5µg/ml BFA, bzw. ohne die Addition dieser Substanzen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch analysiert, um zu untersuchen, ob eine Translokation des bereits vorhandenen GDG-Proteins in der PV über die Membran in das Zytoplasma der Wirtszelle beobachtet werden kann. Die Pfeile markieren eine konzentrierte Fluoreszenz nahe dem Zellkern, welche wahrscheinlich das ER widerspiegelt. DIC = Differentieller Interferenz Kontrast, der weiße Balken entspricht 3 µm.

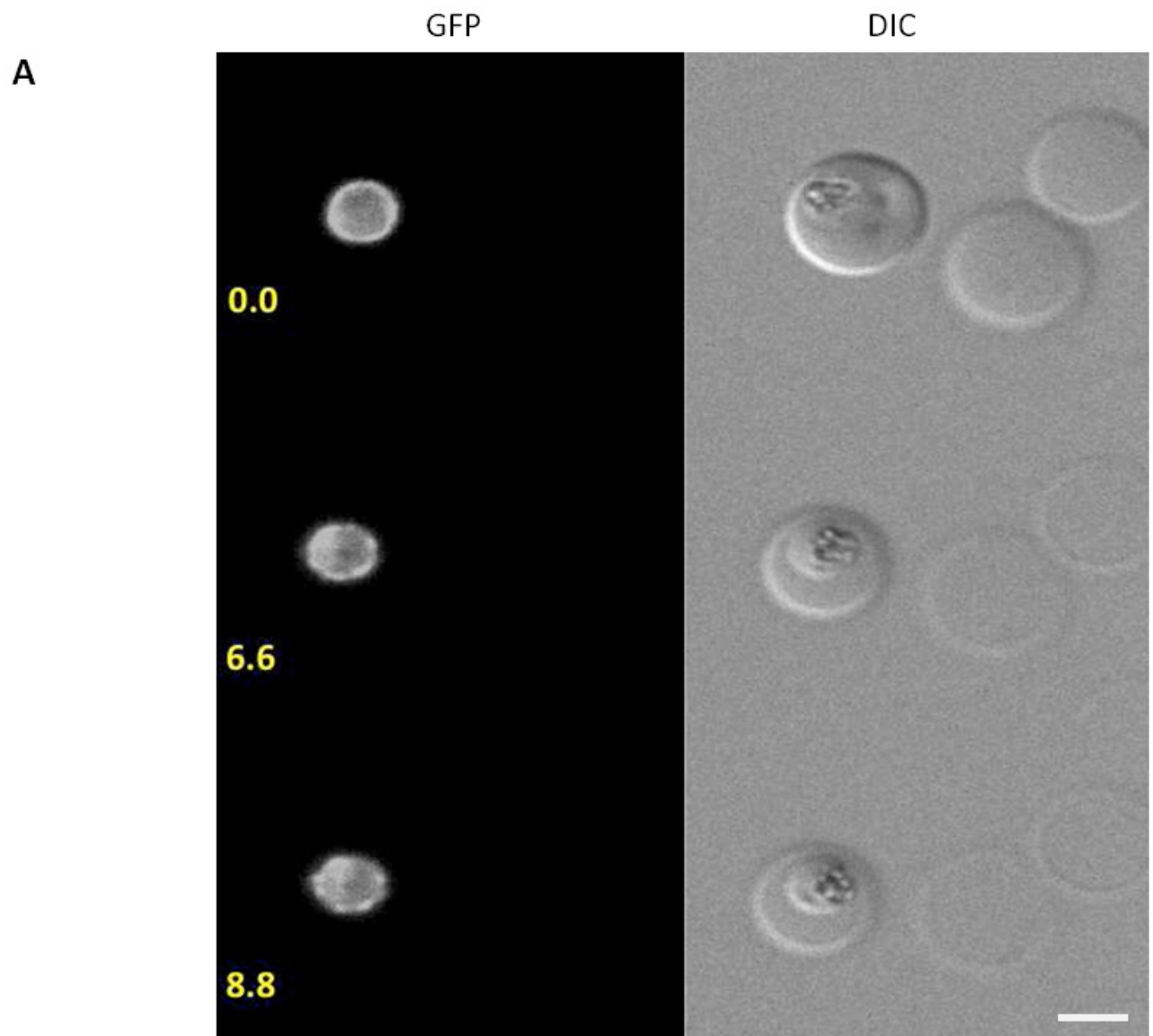
Wie bereits bei dem zuvor gezeigten Experiment in Abb. 22, ist in der Abb. 23 bei der Kontrolle ohne WR und ohne die Zugabe von BFA eine deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma der Wirtszelle detektierbar. Anders verhält es sich mit den Zellen, die mit BFA kultiviert wurden. Hier zeigt sich sowohl unter dem Einfluss von WR, wie auch ohne WR-Addition keine detektierbare Fluoreszenz im Zytoplasma des Erythrozyten. Allerdings kann in beiden Fällen eine verstärkte grüne Fluoreszenz in direkter Nähe des Zellkerns ausgemacht werden, die wahrscheinlich das ER widerspiegelt (orange Pfeile). Dieses Ergebnis zeigt, dass keine Translokation des bereits in PV

vorhandenen Fusionsproteins über die PVM stattfindet und weist damit darauf hin, dass nur neu synthetisierte Proteine über die Membran der parasitophoren Vakuole transportiert werden können. Somit scheint keine Translokation von bereits in der PV vorliegenden und vollständig gefalteten Proteinen zu erfolgen.

3.8 GDG exprimierende Zellen beinhalten nachweisbare Mengen an nicht-fluoreszierendem Fusionsprotein innerhalb der parasitophoren Vakuole

Die Zellfraktionierungsexperimente unter Verwendung von SLO ergaben, dass die GDG-exprimierenden Zellen, die ohne die Zugabe von WR kultiviert wurden, noch deutliche Mengen an Fusionsproteinen in der Pelletfraktion aufwiesen (Abb. 20). Mikroskopische Analysen zeigten hingegen keine Fluoreszenz innerhalb des Parasiten bzw. der PV (Abb. 19). Diese Beobachtung könnte unter anderem damit erklärt werden, dass die mikroskopischen Analysen in ihrer Auflösung nicht hoch genug waren, um eine Detektion an fluoreszierendem Protein innerhalb des Parasiten oder der PV zuzulassen, die aber durch den Western Blot nachweisbar waren (Abb. 20).

Aus diesem Grund wurde eine Lebendzell-SLO-Fraktionierung durchgeführt, die mikroskopisch verfolgt wurde. Dafür wurde eine Kultur der GDG-exprimierenden Zellen geteilt und für einen Zyklus mit bzw. ohne WR kultiviert. Diese Zellen wurden im Anschluss unter Zugabe von 2 HE von SLO analysiert. Eine Lyse der Zellen führt zu einem Verlust des löslichen Inhalts der Wirtszelle, während die Membran der PV und des Parasiten intakt bleibt. Bei Zellen, die ohne Zugabe von WR kultiviert wurden, führt das zusätzlich zu einem Verlust der fluoreszierenden Fusionsproteine aus dem Zytoplasma des Erythrozyten in das umliegende Medium. Falls eine Fluoreszenz in dem Parasiten oder innerhalb der parasitophoren Vakuole vorliegt, die zuvor durch die starke Fluoreszenz des erythrozytären Zytoplasmas überlagert wurde, sollte eine SLO-Permeabilisierung eine Visualisierung dieser fluoreszierenden Fusionsproteine ermöglichen.



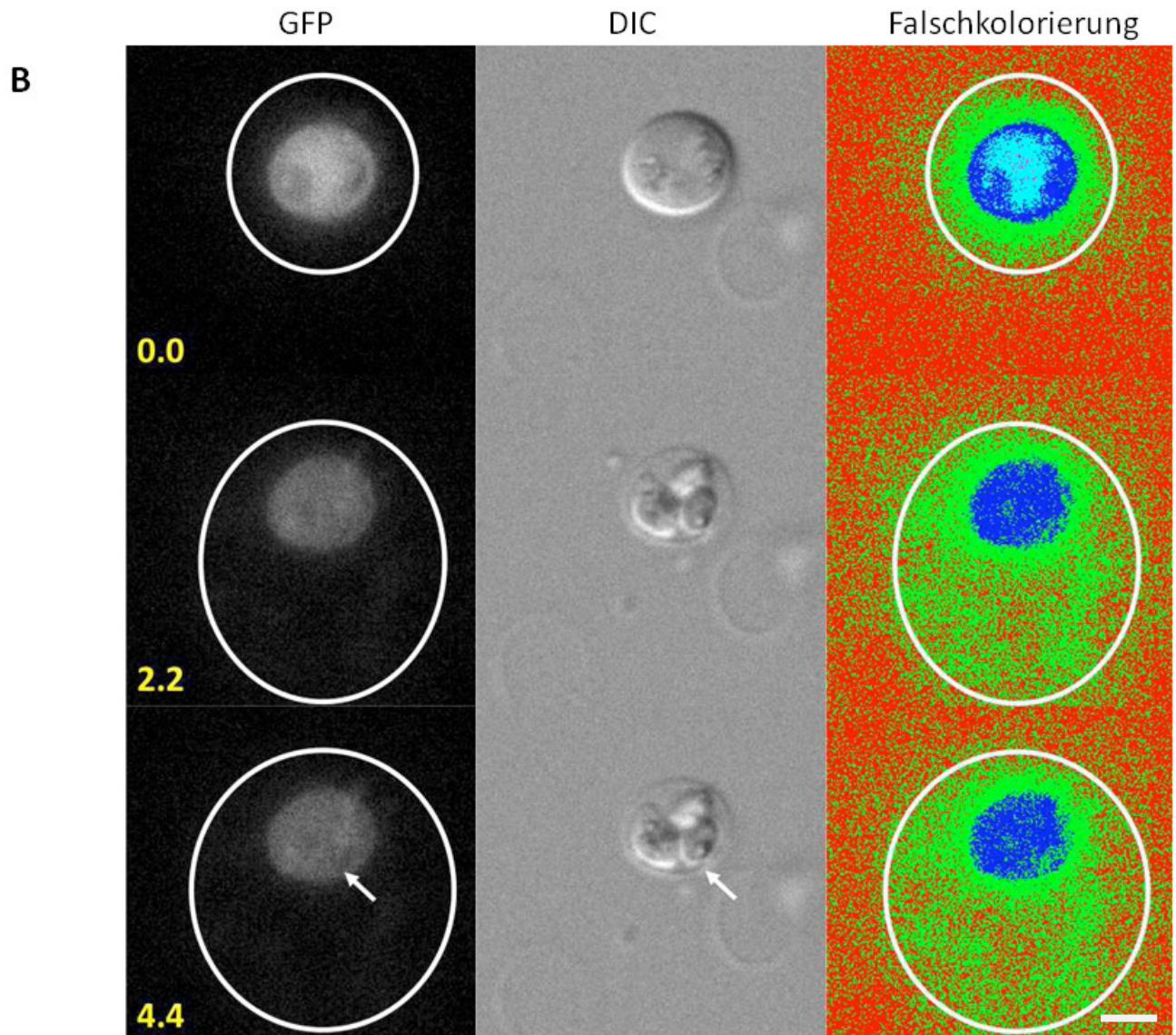


Abbildung 24: Mikroskopische Analyse lebender Zellen während der SLO-Permeabilisierung

A zeigt die SLO-Lyse der Zellen, die mit WR kultiviert wurden. Die Zeitpunkte stellen die Sekunden nach der Addition 2 HE von SLO dar.

B zeigt die Aufnahmen der Zellen, die ohne WR kultiviert wurden. Die Fluoreszenz der GDG-Fusionsproteine diffundiert deutlich aus dem Zytoplasma des infizierten Erythrozyten nach der Permeabilisierung. Um diese Beobachtung deutlicher zu visualisieren, wurde eine Falschkolorierung angewendet (rechte Spalte). Der weiße Balken entspricht 3 μm .

Abb.24, A zeigt die SLO-Permeabilisierung der Zellen, die unter Zugabe von WR kultiviert wurden. Deutlich ist zu erkennen, dass auch nach eingetretener Lyse der erythrozytären Plasmamembran, nach etwa 6,6 Sekunden, die Fluoreszenz der Fusionsproteine in der parasitophoren Vakuole bestehen bleibt. Die Zellen, die ohne WR kultiviert wurden, sind in Abb. 24, B dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 Sekunden kann eine starke Fluoreszenz der GDG-Proteine innerhalb des Wirtszellzytoplasmas

detektiert werden, während keine Detektion der PV durch die Fluoreszenz von Fusionsproteinen möglich ist. Die SLO-Permeabilisierung erfolgte nach etwa 2,2 Sekunden. In der Fluoreszenzaufnahme (linke Spalte) kann eine Freisetzung der Fusionsproteine beobachtet werden. Dabei ist erkennbar, dass auch nach der Entlassung des Wirtszellzytoplasmas keine Fluoreszenz innerhalb der PV detektiert werden kann. Mit diesen Aufnahmen wurde zusätzlich eine Falschkolorierung durchgeführt (rechte Spalte). Dabei wurden sowohl dem Hintergrund (rot), als auch der GFP-Fluoreszenz (grün) eine neue Farbe zugeordnet. Diese Falschkolorierung vereinfacht dadurch die Verfolgung des Fusionsproteins. Doch auch durch diese „Neueinfärbung“ ist keine Detektion innerhalb des Parasiten oder PV möglich. Die mikroskopische Auflösung kann daher wahrscheinlich nicht als Grund für die fehlende Detektion der Fusionsproteine im Parasiten bzw. der PV herangezogen werden. Die durch SLO-Permeabilisierung detektierten Fusionsproteine in der löslichen Fraktion der Pelletfraktion konnten bei den lebenden Zellen mikroskopisch nicht detektiert werden. Dieses könnte auch darin begründet sein, dass diese Proteine nicht in der Lage sind, zu fluoreszieren.

Eine fehlende Fluoreszenz könnte in diesem Zusammenhang durch den Faltungszustand der Fusionsproteine erklärt werden. Eine Fluoreszenz, ausgelöst durch das GFP kann grundsätzlich nur beobachtet werden, wenn sich eine funktionelle Chromophore etablieren konnte (Zimmer, 2002). Bezogen auf den Proteintransport bestünde die Möglichkeit, dass die Fusionsproteine während des Transports nur partiell gefaltet sind und daher keine Fluoreszenz zu beobachten ist. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde ein Immunfluoreszenz-Assay unter Verwendung eines anti-GFP Antikörpers mit Zellen durchgeführt, die ohne WR kultiviert wurden (Tonkin *et al.*, 2004). Der GFP-Antikörper sollte dabei in der Lage sein, auch dann an die Fusionsproteine zu binden, wenn sich diese nicht in ihrer nativen Konformation befinden. Um eine PV Lokalisierung zeigen zu können, wurde der PV1-Antikörper gegen das PV residente Protein PfPV1 eingesetzt (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006).

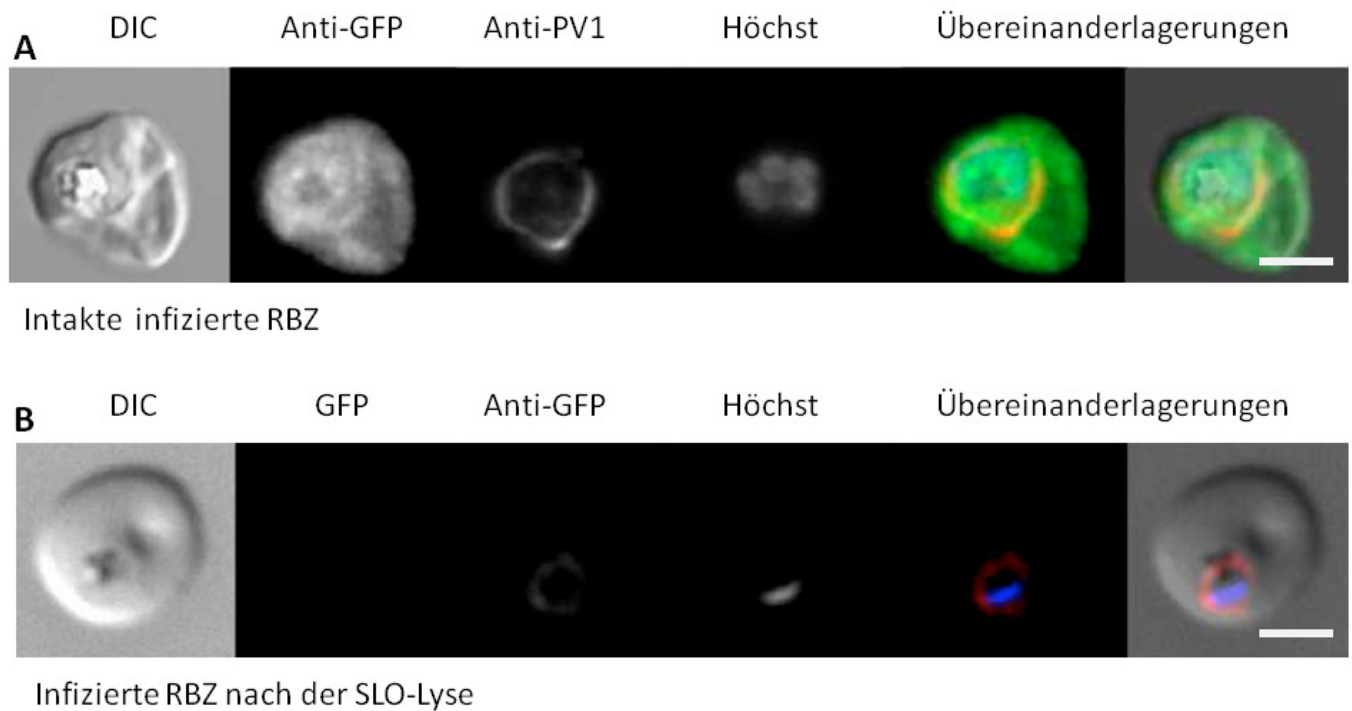


Abbildung 25: Immunfluoreszenz-Assay GDG-exprimierender Zellen vor und nach der SLO-Lyse

Mit intakten (A) wie auch mit SLO-lysierten Zellen (B) wurde ein IFA durchgeführt, bei dem GFP-, sowie PV1-detektiert wurde. In beiden Fällen kann eine ringförmige Fluoreszenz durch den eingesetzten GFP-Antikörper beobachtet werden, die mit dem PV1-Protein kolokalisiert (A). Diese Fluoreszenz ist dabei bei den SLO-permeabilisierten Zellen (B) nur unter Einsatz des Antikörpers zu detektieren. Der weiße Balken entspricht 3 µm.

Wie in Abb. 25, A zu sehen ist, kann in dem Immunfluoreszenz-Assay mit den Zellen, die ohne WR kultiviert wurden, mit Hilfe des anti-GFP Antikörpers eine Fluoreszenz innerhalb der PV detektiert werden, die zu großen Teilen mit der anti-PfPV1 Fluoreszenz kolokalisiert. Dieses Ergebnis ist auch bei den SLO-permeabilisierten Zellen zu sehen (B). In beiden Fällen ist der GFP-Antikörper in der Lage, eine eindeutige Fluoreszenz in der PV zu generieren, die ohne Antikörper nicht zu sehen ist. Dieses deutet darauf hin, dass sich in der PV signifikante Mengen an offensichtlich nicht fluoreszierendem Fusionsprotein befinden. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen Fusionsproteinen um Proteine, die nur partiell gefaltet vorliegen und deren funktioneller GFP-Anteil noch nicht ausgebildet ist.

4. Diskussion

Die Verstärkung der Rigidität seiner Plasmamembran und die Adhäsion an Endothelien sind nur zwei Beispiele der zahlreichen Modifikationen, die ein befallener Erythrozyt durch *Plasmodium falciparum* erfährt. Diese und weitere Veränderungen werden von den geschätzten über 250 exportierten Proteine induziert, die der Parasit in seine Wirtszelle exportiert (van Ooij *et al.*, 2008). So konnte z.B. gezeigt werden, dass das exportierte Protein PfEMP1, zusammen mit dem Knob-assoziierten histidinreichen Protein (KAHRP) auf der Oberfläche der Wirtszelle die elektronendichten Knobs bildet, die eine Adhäsion der Zelle steigern (Crabb *et al.*, 1997). Ein weiteres Protein, RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen) scheint die Hitze-Sensitivität der befallenen roten Blutzelle zu verringern (Silva *et al.*, 2005, Bonnefoy und Menard, 2008).

Um diese Veränderungen zu bewirken und damit sein Überleben zu gewährleisten, muss der Parasit eine Transportmaschinerie etablieren, die nicht nur Proteine über seine eigene Plasmamembran hinaus transportiert, sondern auch zahlreiche Proteine über die Membran der parasitophoren Vakuole in das Zytoplasma der Wirtszelle leitet. Obschon verschiedene Modelle vorgeschlagen wurden, die den Transportmechanismus der exportierten Proteine über die Membran der PV in die Wirtszelle erklären sollten, mehren sich die Hinweise, die für einen Mechanismus sprechen, bei dem die PV als Transitkompartiment fungiert (Lingelbach, 1997). Dieses 2-Schritt Modell konnte unter anderem für GBP130 bestätigt werden, nach dem die Proteine zunächst in die parasitophore Vakuole sezerniert und in einem zweiten Schritt über die Membran der PV transportiert werden (Ansorge *et al.*, 1996). Ein Pentapeptid, das als PEXEL bzw. HT bezeichnet wurde und den Transport über die PVM vermittelt, konnte Ende des Jahres 2004 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander identifiziert und charakterisiert werden (Hiller *et al.*, 2004, Marti *et al.*, 2004). Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass die exportierten Proteine zumeist über eine N-terminale, bzw. eine dem aminoterminalen Ende entrückte Signalsequenz verfügen, die den Eintritt in das ER ermöglicht, und im weiteren Verlauf dann in das Lumen der PV entlassen werden. Das PEXEL/HT-Motiv scheint dann für die Translokation über ein noch nicht identifiziertes Translokon

verantwortlich zu sein. Ungeachtet der Frage, welche Sequenz-Motive welche Transportschritte vermitteln, gab es bisher wenige Studien, die eine Aussage über den Mechanismus der Translokation über die PVM oder die Existenz eines Translokons zulassen würden. Um diesem Ziel ein Stück näher zu kommen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein DHFR-Fusionsprotein-System etabliert und angewendet, welches Aufschlüsse über den Faltungszustand der zu translozierenden Proteine geben soll. Dabei sollte geklärt werden, ob lösliche Proteine während ihres Transports über die PVM in das Zytoplasma des Erythrozyten in einem entfalteten oder gefalteten Zustand vorliegen. Darüber hinaus sollte dieses System auch die Frage klären, ob mehrere Proteine die PV als Transitzkompartiment nutzen und damit das 2-Schritt-Modell unterstützen, oder ob dies nur für das GBP130 und KAHRP der Fall ist (Ansorge *et al.*, 1996, Rug *et al.*, 2006).

Um die genauen Mechanismen des Proteintransports über die PVM in die Wirtszelle aufzuklären, wurden bereits verschiedenste experimentelle Studien durchgeführt. So gelang Ansorge *et al.* die Entwicklung eines Translokationsassays am Beispiel des GBP130. Durch Zellfraktionierung mit Hilfe von SLO, gefolgt von einem Pulse-Chase, erlaubte dieser Assay eine gezielte Untersuchung spezifischer Faktoren, die maßgeblich an der Translokation über die PVM beteiligt sind (Ansorge *et al.*, 1996). Mit Hilfe dieses Assays konnte gezeigt werden, dass GBP130 zunächst in das Lumen der PV entlassen wird und in einem zweiten Schritt über die Membran der PV in das Zytoplasma der Wirtszelle transportiert wird. Dadurch konnte erstmals das 2-Schritt-Modell bestätigt werden. Basierend auf diesem Translokationsassay konnte zudem gezeigt werden, dass Energie in Form von ATP essentiell ist, um die Translokation von GBP130 zu ermöglichen. Dieses spricht für die Beteiligung molekularer Chaperone an dem Translokationsprozess und könnte auf die Existenz eines Translokons innerhalb der PVM hindeuten. Ein großer Teil weiterer Translokationsstudien basierten auf molekularbiologischen Techniken unter Verwendung von Reporterproteinen. Die Verwendung von GFP, fusioniert an unterschiedliche N-terminale Sequenzelemente von KAHRP erlaubte die Analyse des Transportweges dieses Proteins. Dabei konnten unter anderem die Sequenzen identifiziert werden, die das Fusionsprotein in die PV leiten. Diese Lokalisationsstudien ließen die Vermutung zu, dass auch KAHRP die PV als

Intermediärkompartiment nutzt und damit das 2-Schritt-Modell weiter unterstützen (Wickham *et al.*, 2001). Studien einer anderen Arbeitsgruppe deuteten hingegen darauf hin, dass das TVN als ein Sortierungskompartiment dient, welches eine Golgi-ähnliche Morphologie aufweist (Elmendorf *et al.*, 2001). Neuere Studien derselben Arbeitsgruppe postulierten 2008 ein neues Proteinsortierungs-Modell, welches die Maurerschen Spalten als ein sekretorisches Organell vorschlägt, in die die sekretorischen Proteine sortiert und anschließend in das Wirtszellzytoplasma entlassen werden (Bhattacharjee *et al.*, 2008). Auch diese Daten basieren auf Lokalisationsstudien von Fusionsproteinen. Diese verschiedenen Mechanismen beruhen dabei auf Beobachtungen, die durch Fluoreszenz-Lokalisationsstudien gewonnen wurden, wobei keine dynamischen Prozesse beobachtet werden konnten. Durch die Verwendung des DHFR-Fusionsprotein-Systems lassen sich hingegen dynamische Prozesse verfolgen, die sich durch die Zugabe eines Folat-Analogs beeinflussen lassen.

Durch die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind, lassen sich mehrere Rückschlüsse in Bezug auf die verschiedenen Transportmodelle über die PVM ziehen. Die Etablierung des DHFR-Fusionsprotein-Systems ermöglicht eine Unterteilung und Untersuchung einzelner Transportschritte, die lösliche parasitäre Proteine auf dem Weg zu ihrem Funktionsort, dem Zytoplasma der Wirtszelle, erfahren.

Es konnte gezeigt werden, dass lösliche parasitäre Proteine, sobald sie unter dem Einfluss eines, ihre Faltung stabilisierenden Additivs stehen, ihren finalen Lokalisationsort innerhalb des Zytoplasmas des Erythrozyten nicht erreichen können. Vielmehr kommt es zu einer Arretierung innerhalb des Lumens der parasitophoren Vakuole (Kapitel 3.2). Ohne den Einsatz eines Folat-Analogs werden diese Proteine über die Membran der PV transportiert. Unter diesen Umständen sind sie für molekulare Chaperone zugänglich und können in einen translokationskompetenten Zustand gebracht werden, der offensichtlich essentiell für eine erfolgreiche Überquerung der PVM ist. Daraus lassen sich mehrere Schlüsse ziehen, die eine weitere Charakterisierung des Transportmechanismus löslicher Proteine erlauben.

Das 2-Schritt Modell, welches auf der Analyse des GBP130-Proteins basierte, konnte erfolgreich für ein weiteres Protein bestätigt werden (Ansorge *et al.*, 1996). Dieses

impliziert, dass alle löslichen parasitären Proteine, zunächst in einem ersten Schritt in die PV entlassen werden, wonach sie in einem zweiten Schritt über die PVM transloziert werden. Das 1-Schritt-Modell sieht vor, dass Vesikel, die Proteine für das Wirtszellzytoplasma beinhalten, an speziellen Bereichen der parasitären Plasmamembran fusionieren, die in Kontakt mit der PV stehen (Elmendorf und Halder, 1993). Dabei würde der Schritt, über den die Proteine in die PV entlassen werden, entfallen. Bezogen auf das DHFR-Fusionsprotein-System erscheint es bei diesem Modell unwahrscheinlich, dass der Faltungsstatus dieser löslichen Proteine einen Einfluss auf den Transport ausüben kann. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere parallele Transportmechanismen existieren.

Die durchgeführten mikroskopischen Analysen zeigten unter Bedingungen der stabilisierten Fusionsproteine grundsätzlich eine ringförmige Struktur um den Parasiten herum, die durch Kollokalisierung als PV identifiziert werden konnte (Kapitel 3.2). Eine tubuläre Erweiterung der Membran der PV, die für die Existenz des TVN als ein Sortierungskompartiment sprechen könnte, konnte dabei in keinem Fall beobachtet werden. Eine neue Theorie bezüglich des Transports PEXEL/HT-enthaltener Proteine, die Anfang des Jahres 2008 veröffentlicht wurde, sieht vor, dass diese Proteine nicht direkt über die Membran der PV transloziert werden. Vielmehr deuteten ihre Ergebnisse darauf hin, dass das PEXEL/HT-Motiv als ein Sortierungssignal dient, welches die Proteine in die Maurerschen Spalten dirigiert, die dann entweder vom Parasiten direkt oder von der PVM abknospen. Dabei wird angenommen, dass das Motiv von einem Rezeptor innerhalb der Spalten erkannt wird (Bhattacharjee *et al.*, 2008). Durch das DHFR-Fusionsprotein-System erhaltene Daten hingegen zeigen deutlich, dass diese Proteine direkt über die PVM transloziert werden müssen und nicht über die MC sortiert werden. Unterstützt wird dies zudem durch kürzlich veröffentlichte Daten, die zeigen konnten, dass das PEXEL/HT-Motiv bereits im ER des Parasiten erkannt, prozessiert und N-Acetyliert wird (Chang *et al.*, 2008, Boddey *et al.*, 2008). Wo genau und in welchem Ausmaß eine Erkennung und Prozessierung des PEXEL/HT-Motivs erfolgt, kann durch das DHFR-System nicht erschlossen werden. Im Hinblick auf die erhaltenen Daten erscheint eine Sortierung innerhalb der Maurerschen Spalten jedoch unwahrscheinlich. Vielmehr deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die PV als ein Protein-Sortierungskompartiment fungiert und alle löslichen Proteine zunächst in das Lumen der PV transportiert werden.

Durch die Stabilisierung der Fusionsproteine konnte gezeigt werden, dass keine Translokation über die PVM stattfindet. Diese Arretierung der Proteine im Lumen der PV deutet eindeutig daraufhin, dass sich die Proteine in einem translokationskompetenten entfalteten Zustand befinden müssen, um in das Zytoplasma des Erythrozyten zu gelangen. Dies wird auch durch die Beobachtung gestärkt, dass eine Translokation stattfand, wenn kein faltungsstabilisierendes Agens zugegeben wurde. Fusionsproteine konnten unter diesen Bedingungen transloziert werden. Dieses Ergebnis spricht eindeutig für die Existenz eines Translokons innerhalb der PVM. Eine Frage, die sich in diesem Zusammenhang stellt, ist ob sich die Proteine bereits in einem translokationskompetenten Zustand beim Erreichen der PV befinden, oder ob sie erst im Lumen der PV in diesen gebracht werden. Auch hier kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass beide Zustände bestehen, allerdings kann bei den hier untersuchten Proteinen vermutet werden, dass die Proteine zumindest teils gefaltet die PV erreichen und vor dem Translokationsprozess innerhalb des Lumens der PV entfaltet werden. Wie bereits beschrieben, erfolgt die Bindung des Folat-Analogs an dem aktiven Zentrum des murinen DHFR (Salvador *et al.*, 2000). Dieses setzt voraus, dass zumindest der DHFR-Anteil innerhalb des Fusionsproteins gefaltet ist und lässt es unwahrscheinlich erscheinen, dass die Proteine bereits vorher in einem entfalteten Zustand vorliegen. Wie der Entfaltungsprozess in der PV abläuft, ist bis jetzt nicht geklärt. Die enorme Abundanz an Chaperonen innerhalb der PV könnte dabei jedoch eine nicht unwesentliche Rolle spielen (Nyalwidhe und Lingelbach, 2006). Auch die Daten von Ansorge, die eine Notwendigkeit von Energie in Form von ATP für eine Translokation von GBP130 beweisen konnten, befürworten die Involvierung molekularer Chaperone an diesem Prozess. Die Beschaffenheit und der Ursprung des Translokons konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Allerdings sprechen die Daten für einen Translokon, der ähnlich wie beim Import in die Mitochondrien und Chloroplasten eine Entfaltung des zu translozierenden Proteins voraussetzt (Rapaport *et al.*, 1997, Oreb *et al.*, 2008).

4.1 Ausblick

In dieser Arbeit konnte ein DHFR-Fusionsprotein-System in *Plasmodium falciparum* etabliert werden, dessen Anwendung Aussagen über den Faltungszustand eines löslichen Proteins während der Translokation über die PVM zulassen. Es konnte gezeigt werden, dass eine stabilisierte Faltung den Transport über die PVM inhibiert, was zum einen das 2-Schritt-Modell unterstützt und zudem für einen Translokator spricht, der Proteine in einem translokationskompetenten Zustand transloziert.

In dieser Studie wurden zwei PEXEL/HT-enthaltene Proteine verwendet. Um zu klären, ob PEXEL/HT-negative Proteine ebenfalls über diesen Transportweg in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen, wäre eine Anwendung dieses Systems sinnvoll. Zudem könnte dieses System genutzt werden, um auch Membranproteine zu untersuchen und festzustellen, inwieweit Faltung diesen Transportweg beeinflusst. Des Weiteren konnte keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob die löslichen Proteine bereits in einem translokationskompetenten Zustand die PV erreichen, oder ob eine Entfaltung erst im Lumen der PV erfolgt. Die Daten deuten an, dass zumindest der DHFR-Anteil in einem gefalteten Zustand in der PV vorliegt. Allerdings zeigen die Ergebnisse in Bezug auf GFP, dass eine aktive Chromophore noch nicht ausgebildet und eine vollständige Faltung innerhalb des Lumens der PV nicht stattgefunden hat. Die Tatsache, dass es sich bei der Faltung von GFP um einen autokatalytischen Prozess handelt, der relativ langsam ist, wirft in diesem Zusammenhang die Frage auf, ob die Verwendung eines anderen Reporterproteins geeigneter wäre, Aussagen über den Faltungsstatus beim Erreichen der PV zuzulassen.

Das DHFR-Fusionsprotein-System ließ in dieser Arbeit keine Identifizierung des Translokons oder daran beteiligte Komponenten zu, jedoch könnten weiterführende Experimente, mit Hilfe von Crosslinking-Studien, ausgearbeitet werden, die eine Analyse der einzelnen Komponenten und Komplexe ermöglichen würden. Mit diesen und weiteren Anwendungen, bezüglich anderer Transportprozesse, bietet das etablierte System eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten die Transportprozesse des Parasiten in seiner Wirtszelle zu untersuchen und aufzuklären.

IV. Literaturverzeichnis

Alavian, C.N., Politz, J.C.R., Lewandowski, L.B., Powers, C.M. and Pederson, T. (2004) Nuclear export of signal recognition particle RNA in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 313, 351-55.

Amino, R., Giovannini, D., Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J., Prevost, M., Ishino, T., Yuda, M. and Menard, R. (2008) Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe*, 3, 88-96.

Amino, R., Giovannini, D., Thiberge, S., Gueirard, P., Boisson, B., Dubremetz, J., Prevost, M., Ishino, T., Yuda, M. and Menard, R. (2008) Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe*, 3, 88-96.

Ansorge, I., Benting, J., Bhakdi, S. and Lingelbach, K. (1996) Protein sorting in Plasmodium falciparum-infected red blood cells permeabilized with the pore-forming protein streptolysin O. *Biochem J*, 315 (Pt 1), 307-14.

Backhaus, R., Zehe, C., Wegehling, S., Kehlenbach, A., Schwappach, B. and Nickel, W. (2004) Unconventional protein secretion: membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *J Cell Sci*, 117, 1727-36.

Bannister, L.H., Mitchell, G.H., Butcher, G.A. and Dennis, E.D. (1986) Lamellar membranes associated with rhoptries in erythrocytic merozoites of Plasmodium knowlesi: a clue to the mechanism of invasion. *Parasitology*, 92 (Pt 2), 291-303.

Bannister, L.H., Hopkins, J.M., Fowler, R.E., Krishna, S. and Mitchell, G.H. (2000) A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *Parasitol Today*, 16, 427-33.

Baumeister, S., Paprotka, K., Bhakdi, S. and Lingelbach, K. (2001) Selective permeabilization of infected host cells with pore-forming proteins provides a novel tool to study protein synthesis and viability of the intracellular apicomplexan parasites Plasmodium falciparum and Toxoplasma gondii. *Mol Biochem Parasitol*, 112, 133-7.

Beaumelle, B.D., Vial, H.J. and Philippot, J.R. (1987) Reevaluation, using marker enzymes, of the ability of saponin and ammonium chloride to free Plasmodium from infected erythrocytes. *J Parasitol*, 73, 743-8.

Benting, J., Mattei, D. and Lingelbach, K. (1994) Brefeldin A inhibits transport of the glycophorin-binding protein from Plasmodium falciparum into the host erythrocyte. *Biochem J*, 300 (Pt 3), 821-6.

Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Balu, B., Adams, J.H. and Haldar, K. (2008) Maurer's clefts of Plasmodium falciparum are secretory organelles that concentrate virulence protein reporters for

IV. Literaturverzeichnis

delivery to the host erythrocyte. *Blood*, 111, 2418-26.

Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. and Gotschlich, E.C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem*, 136, 175-9.

Blobel, G. and Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, 67, 835-51.

Boddey, J.A., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Cowman, A.F. (2008) Role of the Plasmodium Export Element in trafficking parasite proteins to the infected erythrocyte. *Traffic*, .

Botha, M., Pesce, E. and Blatch, G.L. (2007) The Hsp40 proteins of Plasmodium falciparum and other apicomplexa: regulating chaperone power in the parasite and the host. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 1781-803.

Brown, L. and Baker, A. (2008) Shuttles and cycles: transport of proteins into the peroxisome matrix (review). *Mol Membr Biol*, 25, 363-75.

Carruthers, V.B. and Sibley, L.D. (1999) Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in Toxoplasma gondii. *Mol Microbiol*, 31, 421-8.

Chang, H.H., Falick, A.M., Carlton, P.M., Sedat, J.W., DeRisi, J.L. and Marletta, M.A. (2008) N-terminal processing of proteins exported by malaria parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 160, 107-15.

Charpian, S. and Przyborski, J.M. (2008) Protein transport across the parasitophorous vacuole of Plasmodium falciparum: into the great wide open. *Traffic*, 9, 157-65.

Cooke, B.M., Lingelbach, K., Bannister, L.H. and Tilley, L. (2004) Protein trafficking in Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Trends Parasitol*, 20, 581-9.

Cowman, A.F. and Crabb, B.S. (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124, 755-66.

Cox-Singh, J. and Singh, B. (2008) Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? . *Trends Parasitol*, 24, 406-10.

Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (1996) Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7289-94.

Crabb, B.S., Cooke, B.M., Reeder, J.C., Waller, R.F., Caruana, S.R., Davern, K.M., Wickham, M.E., Brown, G.V., Coppel, R.L. and Cowman, A.F. (1997) Targeted gene disruption shows that knobs enable malaria-infected red cells to cytoadhere under physiological shear stress. *Cell*, 89, 287-96.

IV. Literaturverzeichnis

- Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. and Stemmer, W.P. (1996) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat Biotechnol*, 14, 315-9.
- Denecke, J., Botterman, J. and Deblaere, R. (1990) Protein secretion in plant cells can occur via a default pathway. *Plant Cell*, 2, 51-9.
- Doherty, J.P., Lindeman, R., Trent, R.J., Graham, M.W. and Woodcock, D.M. (1993) Escherichia coli host strains SURE and SRB fail to preserve a palindrome cloned in lambda phage: improved alternate host strains. *Gene*, 124, 29-35.
- Doudna, J.A. and Batey, R.T. (2004) Structural insights into the signal recognition particle. *Annu Rev Biochem*, 73, 539-57.
- Eilers, M. and Schatz, G. (1986) Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria. *Nature*, 322, 228-32.
- Elmendorf, H.G. and Haldar, K. (1993) Secretory transport in Plasmodium. *Parasitol Today*, 9, 98-102.
- Elmendorf, H.G. and Haldar, K. (1994) Plasmodium falciparum exports the Golgi marker sphingomyelin synthase into a tubovesicular network in the cytoplasm of mature erythrocytes. *J Cell Biol*, 124, 449-62.
- Ewetz, L. and Thore, A. (1976) Factors affecting the specificity of the luminol reaction with hematin compounds. *Anal Biochem*, 71, 564-70.
- Farquhar, M.G. and Palade, G.E. (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol*, 8, 2-10.
- Francis, S.E., Banerjee, R. and Goldberg, D.E. (1997) Biosynthesis and maturation of the malaria aspartic hemoglobins plasmeplins I and II. *J Biol Chem*, 272, 14961-8.
- Frankland, S., Adisa, A., Horrocks, P., Taraschi, T.F., Schneider, T., Elliott, S.R., Rogerson, S.J., Knuepfer, E., Cowman, A.F., Newbold, C.I. and Tilley, L. (2006) Delivery of the malaria virulence protein PfEMP1 to the erythrocyte surface requires cholesterol-rich domains. *Eukaryot Cell*, 5, 849-60.
- Frevert, U. (2004) Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol*, 20, 417-24.
- Fujioka, H. and Aikawa, M. (1993) Morphological changes of clefts in Plasmodium-infected erythrocytes under adverse conditions. *Exp Parasitol*, 76, 302-7.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., Carlton, J.M., Pain, A., Nelson, K.E., Bowman, S., Paulsen, I.T., James, K., Eisen, J.A., Rutherford, K., Salzberg, S.L., Craig, A., Kyes, S., Chan, M., Nene, V., Shallom, S.J., Suh, B., Peterson, J., Angiuoli, S., Pertea, M., Allen, J., Selengut, J., Haft, D., Mather, M.W., Vaidya, A.B. and Martin, D.M. (2002) Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature*, 419, 498-

IV. Literaturverzeichnis

511.

Gilmore, R., Blobel, G. and Walter, P. (1982) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol*, 95, 463-9.

Gouagna, L.C., Ferguson, H.M., Okech, B.A., Killeen, G.F., Kabiru, E.W., Beier, J.C., Githure, J.I. and Yan, G. (2004) Plasmodium falciparum malaria disease manifestations in humans and transmission to Anopheles gambiae: a field study in Western Kenya. *Parasitology*, 128, 235-43.

Guerra, C.A., Gikandi, P.W., Tatem, A.J., Noor, A.M., Smith, D.L., Hay, S.I. and Snow, R.W. (2008) The limits and intensity of Plasmodium falciparum transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med*, 5, e38.

Gunther, K., Tummler, M., Arnold, H.H., Ridley, R., Goman, M., Scaife, J.G. and Lingelbach, K. (1991) An exported protein of Plasmodium falciparum is synthesized as an integral membrane protein. *Mol Biochem Parasitol*, 46, 149-57.

Hackett, L. (1941) Malaria and the community (clone). *human malaria.american association for the advancement of science*, 148-156.

Haldar, K. and Mohandas, N. (2007) Erythrocyte remodeling by malaria parasites. *Curr Opin Hematol*, 14, 203-9.

Hartman, P.G. (1993) Molecular aspects and mechanism of action of dihydrofolate reductase inhibitors. *J Chemother*, 5, 369-76.

Hausler, T., Stierhof, Y.D., Wirtz, E. and Clayton, C. (1996) Import of a DHFR hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the folate-analogue aminopterin. *J Cell Biol*, 132, 311-24.

Hay, S.I., Smith, D.L. and Snow, R.W. (2008) Measuring malaria endemicity from intense to interrupted transmission. *Lancet Infect Dis*, 8, 369-78.

Heim, R., Prasher, D.C. and Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 12501-4.

Hiller, N.L., Akompong, T., Morrow, J.S., Holder, A.A. and Haldar, K. (2003) Identification of a stomatin orthologue in vacuoles induced in human erythrocytes by malaria parasites. A role for microbial raft proteins in apicomplexan vacuole biogenesis. *J Biol Chem*, 278, 48413-21.

Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C. and Haldar, K. (2004) A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science*, 306, 1934-7.

Jackson, K.E., Spielmann, T., Hanssen, E., Adisa, A., Separovic, F., Dixon, M.W.A., Trenholme, K.R., Hawthorne, P.L., Gardiner, D.L., Gilberger, T. and Tilley, L. (2007) Selective permeabilization of the host cell membrane of Plasmodium falciparum-infected red blood cells with streptolysin O and equinatoxin II. *Biochem J*, 403, 167-75.

IV. Literaturverzeichnis

- Jarvis, P. (2008) Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol*, 179, 257-85.
- Kats, L.M., Cooke, B.M., Coppel, R.L. and Black, C.G. (2008) Protein trafficking to apical organelles of malaria parasites - building an invasion machine. *Traffic*, 9, 176-86.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M. and Walter, P. (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem*, 70, 755-75.
- Kessler, F. and Schnell, D.J. (2006) The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. *Traffic*, 7, 248-57.
- Knuepfer, E., Rug, M., Klonis, N., Tilley, L. and Cowman, A.F. (2005) Trafficking determinants for PfEMP3 export and assembly under the Plasmodium falciparum-infected red blood cell membrane. *Mol Microbiol*, 58, 1039-53.
- Knuepfer, E., Rug, M., Klonis, N., Tilley, L. and Cowman, A.F. (2005) Trafficking of the major virulence factor to the surface of transfected P. falciparum-infected erythrocytes. *Blood*, 105, 4078-87.
- Kunkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell*, 93, 1009-19.
- Langreth, S.G., Jensen, J.B., Reese, R.T. and Trager, W. (1978) Fine structure of human malaria in vitro. *J Protozool*, 25, 443-52.
- Lauer, S.A., Rathod, P.K., Ghori, N. and Haldar, K. (1997) A membrane network for nutrient import in red cells infected with the malaria parasite. *Science*, 276, 1122-5.
- Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B.U., Hiller, N.L., Mohandas, N. and Haldar, K. (2000) Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *EMBO J*, 19, 3556-64.
- Lingelbach, K. (1997) Protein trafficking in the Plasmodium-falciparum-infected erythrocyte--from models to mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol*, 91, 543-9.
- Lingelbach, K. and Joiner, K.A. (1998) The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci*, 111 (Pt 11), 1467-75.
- Lingelbach, K. and Przyborski, J.M. (2006) The long and winding road: protein trafficking mechanisms in the Plasmodium falciparum infected erythrocyte. *Mol Biochem Parasitol*, 147, 1-8.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L.C., Bonifacino, J.S. and Klausner, R.D. (1989) Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for

IV. Literaturverzeichnis

membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*, 56, 801-13.

Maier, A.G., Rug, M., O'Neill, M.T., Brown, M., Chakravorty, S., Szestak, T., Chesson, J., Wu, Y., Hughes, K., Coppel, R.L., Newbold, C., Beeson, J.G., Craig, A., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2008) Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Cell*, 134, 48-61.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1987) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E. and Cowman, A.F. (2004) Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, 306, 1930-3.

Matuschewski, K. (2006) Getting infectious: formation and maturation of *Plasmodium* sporozoites in the *Anopheles* vector. *Cell Microbiol*, 8, 1547-56.

McKenzie, F.E., Jeffery, G.M. and Collins, W.E. (2007) Gametocytemia and fever in human malaria infections. *J Parasitol*, 93, 627-33.

McNew, J.A. and Goodman, J.M. (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol*, 127, 1245-57.

Mota, M.M. and Rodriguez, A. (2002) Invasion of mammalian host cells by *Plasmodium* sporozoites. *Bioessays*, 24, 149-56.

Murphy, S.C., Samuel, B.U., Harrison, T., Speicher, K.D., Speicher, D.W., Reid, M.E., Prohaska, R., Low, P.S., Tanner, M.J., Mohandas, N. and Haldar, K. (2004) Erythrocyte detergent-resistant membrane proteins: their characterization and selective uptake during malarial infection. *Blood*, 103, 1920-8.

Nagai, K., Oubridge, C., Kuglstatter, A., Menichelli, E., Isel, C. and Jovine, L. (2003) Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *EMBO J*, 22, 3479-85.

Nagao, E., Kaneko, O. and Dvorak, J.A. (2000) *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: qualitative and quantitative analyses of parasite-induced knobs by atomic force microscopy. *J Struct Biol*, 130, 34-44.

Noe, A.R., Fishkind, D.J. and Adams, J.H. (2000) Spatial and temporal dynamics of the secretory pathway during differentiation of the *Plasmodium yoelii* schizont. *Mol Biochem Parasitol*, 108, 169-85.

Nyalwidhe, J. and Lingelbach, K. (2006) Proteases and chaperones are the most abundant proteins in the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proteomics*, 6, 1563-73.

Oreb, M., Tews, I. and Schleiff, E. (2008) Policing Tic 'n' Toc, the doorway to chloroplasts. *Trends Cell Biol*, 18, 19-27.

IV. Literaturverzeichnis

Pain, A., Bohme, U., Berry, A.E., Mungall, K., Finn, R.D., Jackson, A.P., Mourier, T., Mistry, J., Pasini, E.M., Aslett, M.A., Balasubrammaniam, S., Borgwardt, K., Brooks, K., Carret, C., Carver, T.J., Cherevach, I., Chillingworth, T., Clark, T.G., Galinski, M.R., Hall, N., Harper, D., Harris, D., Hauser, H., Ivens, A., Janssen, C.S., Keane, T., Larke, N., Lapp, S., Marti, M., Moule, S., Meyer, I.M., Ormond, D., Peters, N., Sanders, M., Sanders, S., Sargeant, T.J., Simmonds, M. and Smith, (2008) The genome of the simian and human malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. *Nature*, 455, 799-803.

Palmer, M., Harris, R., Freytag, C., Kehoe, M., Trandum-Jensen, J. and Bhakdi, S. (1998) Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: the early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *EMBO J*, 17, 1598-605.

Pederson, T. (1999) Movement and localization of RNA in the cell nucleus. *FASEB J*, 13 Suppl 2, S238-42.

Pologe, L.G. and Ravetch, J.V. (1986) A chromosomal rearrangement in a *P. falciparum* histidine-rich protein gene is associated with the knobless phenotype. *Nature*, 322, 474-7.

Przyborski, J. and Lanzer, M. (2004) Parasitology. The malarial secretome. *Science*, 306, 1897-8.

Przyborski, J.M., Miller, S.K., Pfahler, J.M., Henrich, P.P., Rohrbach, P., Crabb, B.S. and Lanzer, M. (2005) Trafficking of STEVOR to the Maurer's clefts in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *EMBO J*, 24, 2306-17.

Rapaport, D., Neupert, W. and Lill, R. (1997) Mitochondrial protein import. Tom40 plays a major role in targeting and translocation of preproteins by forming a specific binding site for the presequence. *J Biol Chem*, 272, 18725-31.

Rassow, J., Guiard, B., Wienhues, U., Herzog, V., Hartl, F.U. and Neupert, W. (1989) Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites. *J Cell Biol*, 109, 1421-8.

Robineau, S., Chabre, M. and Antonny, B. (2000) Binding site of brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9913-8.

Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Muller, M. and Wu, L.F. (1999) Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial tat pathway. *J Biol Chem*, 274, 13223-8.

Rug, M., Prescott, S.W., Fernandez, K.M., Cooke, B.M. and Cowman, A.F. (2006) The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood*, 108, 370-8.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA

IV. Literaturverzeichnis

polymerase. *Science*, 239, 487-91.

Salvador, N., Aguado, C., Horst, M. and Knecht, E. (2000) Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem*, 275, 27447-56.

Sargeant, T.J., Marti, M., Caler, E., Carlton, J.M., Simpson, K., Speed, T.P. and Cowman, A.F. (2006) Lineage-specific expansion of proteins exported to erythrocytes in malaria parasites. *Genome Biol*, 7, R12.

Sargent, F. (2007) The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes. *Biochem Soc Trans*, 35, 835-47.

Scales, S.J., Gomez, M. and Kreis, T.E. (2000) Coat proteins regulating membrane traffic. *Int Rev Cytol*, 195, 67-144.

Schatz, G. and Dobberstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271, 1519-26.

Sharma, S., Pradhan, A., Chauhan, V.S. and Tuteja, R. (2005) Isolation and characterization of type I signal peptidase of different malaria parasites. *J Biomed Biotechnol*, 2005, 301-9.

Sidjanski, S. and Vanderberg, J.P. (1997) Delayed migration of Plasmodium sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *Am J Trop Med Hyg*, 57, 426-9.

Silva, M.D., Cooke, B.M., Guillotte, M., Buckingham, D.W., Sauzet, J., Le Scanf, C., Contamin, H., David, P., Mercereau-Puijalon, O. and Bonnefoy, S. (2005) A role for the Plasmodium falciparum RESA protein in resistance against heat shock demonstrated using gene disruption. *Mol Microbiol*, 56, 990-1003.

Snow, R.W., Guerra, C.A., Mutheu, J.J. and Hay, S.I. (2008) International funding for malaria control in relation to populations at risk of stable Plasmodium falciparum transmission. *PLoS Med*, 5, e142.

Soll, J. and Schleiff, E. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 198-208.

Spielmann, T., Hawthorne, P.L., Dixon, M.W.A., Hannemann, M., Klotz, K., Kemp, D.J., Klonis, N., Tilley, L., Trenholme, K.R. and Gardiner, D.L. (2006) A cluster of ring stage-specific genes linked to a locus implicated in cytoadherence in Plasmodium falciparum codes for PEXEL-negative and PEXEL-positive proteins exported into the host cell. *Mol Biol Cell*, 17, 3613-24.

Spycher, C., Rug, M., Klonis, N., Ferguson, D.J.P., Cowman, A.F., Beck, H. and Tilley, L. (2006) Genesis of and trafficking to the Maurer's clefts of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Mol Cell Biol*, 26, 4074-85.

Stephens, D.J., Lin-Marq, N., Pagano, A., Pepperkok, R. and Paccard, J.P. (2000) COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit

IV. Literaturverzeichnis

sites. *J Cell Sci*, 113 (Pt 12), 2177-85.

Stephenson, K. (2005) Sec-dependent protein translocation across biological membranes: evolutionary conservation of an essential protein transport pathway *Mol Membr Biol*, 22, 17-28.

Struck, N.S., de Souza Dias, S., Langer, C., Marti, M., Pearce, J.A., Cowman, A.F. and Gilberger, T.W. (2005) Re-defining the Golgi complex in *Plasmodium falciparum* using the novel Golgi marker PfGRASP. *J Cell Sci*, 118, 5603-13.

Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., Krueger, A., Pollok, J., Menard, R. and Heussler, V.T. (2006) Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*, 313, 1287-90.

Suss-Toby, E., Zimmerberg, J. and Ward, G.E. (1996) Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 8413-8.

Talman, A.M., Domarle, O., McKenzie, F.E., Arie, F. and Robert, V. (2004) Gametocytogenesis: the puberty of *Plasmodium falciparum*. *Malar J*, 3, 24.

Tardieux, I. and Menard, R. (2008) Migration of Apicomplexa across biological barriers: the Toxoplasma and Plasmodium rides. *Traffic*, 9, 627-35.

Tewari, R., Dorin, D., Moon, R., Doerig, C. and Billker, O. (2005) An atypical mitogen-activated protein kinase controls cytokinesis and flagellar motility during male gamete formation in a malaria parasite. *Mol Microbiol*, 58, 1253-63.

Tonkin, C.J., van Dooren, G.G., Spurck, T.P., Struck, N.S., Good, R.T., Handman, E., Cowman, A.F. and McFadden, G.I. (2004) Localization of organellar proteins in *Plasmodium falciparum* using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol Biochem Parasitol*, 137, 13-21.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.

Tuteja, R. (2007) Unraveling the components of protein translocation pathway in human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Arch Biochem Biophys*, 467, 249-60.

van Dooren, G.G., Marti, M., Tonkin, C.J., Stimmler, L.M., Cowman, A.F. and McFadden, G.I. (2005) Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol*, 57, 405-19.

van Ooij, C., Tamez, P., Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Harrison, T., Liolios, K., Kooij, T., Ramesar, J., Balu, B., Adams, J., Waters, A., Janse, C. and Haldar, K. (2008) The malaria secretome: from algorithms to essential function in blood stage infection. *PLoS Pathog*, 4, e1000084.

IV. Literaturverzeichnis

- Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A. and Kafatos, F.C. (2006) The developmental migration of Plasmodium in mosquitoes. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 384-91.
- von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol*, 184, 99-105.
- von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res*, 14, 4683-90.
- von Heijne, G. (1990) The signal peptide. *J Membr Biol*, 115, 195-201.
- Walton, P.A. (1996) Import of stably-folded proteins into peroxisomes. *Ann N Y Acad Sci*, 804, 76-85.
- Ward, W.W. and Bokman, S.H. (1982) Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*, 21, 4535-40.
- Wickert, H., Wissing, F., Andrews, K.T., Stich, A., Krohne, G. and Lanzer, M. (2003) Evidence for trafficking of PfEMP1 to the surface of P. falciparum-infected erythrocytes via a complex membrane network. *Eur J Cell Biol*, 82, 271-84.
- Wickert, H., Gottler, W., Krohne, G. and Lanzer, M. (2004) Maurer's cleft organization in the cytoplasm of plasmodium falciparum-infected erythrocytes: new insights from three-dimensional reconstruction of serial ultrathin sections. *Eur J Cell Biol*, 83, 567-82.
- Wickert, H. and Krohne, G. (2007) The complex morphology of Maurer's clefts: from discovery to three-dimensional reconstructions. *Trends Parasitol*, 23, 502-9.
- Wickham, M.E., Rug, M., Ralph, S.A., Klonis, N., McFadden, G.I., Tilley, L. and Cowman, A.F. (2001) Trafficking and assembly of the cytoadherence complex in Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes. *EMBO J*, 20, 5636-49.
- Wienhues, U., Becker, K., Schleyer, M., Guiard, B., Tropschug, M., Horwich, A.L., Pfanner, N. and Neupert, W. (1991) Protein folding causes an arrest of preprotein translocation into mitochondria in vivo. *J Cell Biol*, 115, 1601-9.
- Zimmer, M. (2002) Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev*, 102, 759-81.

V. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verbreitung von <i>Plasmodium falciparum</i>	9
Abb. 2: Schematische Darstellung der Entwicklungsschritte von <i>P. falciparum</i> in der weiblichen Mücke der Gattung <i>Anopheles</i> (frei nach Mota M)	11
Abb. 3: Schematische Darstellung der Entwicklungsschritte im Menschen (frei nach Mota M)	14
Abb. 4: Schematischer Querschnitt durch einen infizierten Erythrozyten	19
Abb. 5: Schematische Darstellung des Proteintransports über die PVM nach dem 1-Schritt und dem 2-Schritt Modell	23
Abb. 6: Möglicher Einfluss der Faltung auf den Export parasitenkodierter Proteine in das Zytoplasma der Wirtszelle	30
Abb.7: Schematische Darstellung der verwendeten Fusionsproteine	63
Abb. 8: Mikroskopische Analyse der DHFR-GFP exprimierenden Zellen	64
Abb. 9: Protease-Protektions-Assay unter Verwendung von Aminopterin (AP)	65
Abb. 10: Protease-Protektions-Assay zum Test der endogenen Proteasen	67
Abb. 11: Protease-Protektions-Assay mit WR99210 (WR) und AP	69
Abb. 12: Mikroskopische Analyse der STEVOR-DHFR-GFP exprimierenden Zellen	72
Abb. 13: Streptolysin O (SLO) Fraktionierung mit SDG-exprimierenden Zellen infizierte RBZ.....	73
Abb. 14: Mikroskopische Analyse der GBP130-DHFR-GFP exprimierenden Zellen	76
Abb. 15: Kolokalisationsstudie durch ein Immunfluoreszenz-Assay mit anti-PV1	77
Abb. 16: Streptolysin O (SLO) Fraktionierung mit GDG-exprimierenden Zellen infizierte RBZ.....	78
Abb. 17: Einfluss der WR-Konzentration auf die Translokationseffizienz des GDG-Fusionsproteins	80
Abb. 18: Untersuchung der Löslichkeit der SDG-Fusionsproteine mit Hilfe von Ultrazentrifugation	82
Abb. 19: Mikroskopische Analyse der GBP130-GFP exprimierenden Zellen.....	84
Abb. 20: Streptolysin O (SLO) Fraktionierung mit GG-exprimierenden Parasiten infizierter RBZ.....	85

Abb. 21: <i>In vitro</i> -Stabilitätsstudie des DHFR-WR-Komplexes mit SDG-Proteinextrakten	86
Abb. 22: <i>In vivo</i> Stabilitätsstudie des DHFR-WR-Komplexes mit GDG-exprimierenden Zellen	88
Abb. 23: Der Einfluss von BFA auf den Transport des GDG-Fusionsproteins in infizierten Erythrozyten	90
Abb. 24: Mikroskopische Analyse lebender Zellen während der SLO-Permeabilisierung.....	93
Abb. 25: Immunfluoreszenz-Assay GDG-exprimierender Zellen vor und nach der SLO-Lyse	95

VI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Basis-Protokoll einer Standard-PCR	49
Tabelle 3: Typische Zusammensetzung einer PCR mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl	50

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach für alles bedanken, die Unterstützung, die Motivation, die Korrekturen Ich werde Ihnen immer verbunden bleiben und hoffe, dass sich unsere Wege noch mehrmals kreuzen werden.

Dr. Jude M. Przyborski möchte ich für dieses Thema, seine Betreuung und die damit verbundenen Möglichkeiten ganz besonders danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uwe G. Maier für die Erstellung des Zweitgutachtens über diese Arbeit.

Als assoziiertes Mitglied danke ich dem DFG-Graduiertenkolleg 1216 „Intra- and Intercellular Transport and Communication“ für die Unterstützung und die Förderung.

Ich möchte mich bei der gesamten Abteilung Parasitologie und auch den ehemaligen Mitgliedern dieser Abteilung bedanken. Obwohl es ab und an drunter und drüber ging, war es meist eine sehr schöne Zeit. Mein besonderer Dank gilt dabei Trang und Simone Sp. Ich werde euch vermissen.

Meinen Freunden und Mitbewohnern danke für ihre Unterstützung und einfach für alles. Bleibt so wie ihr seid, Besser geht's nicht. Ich vermisse euch jetzt schon, ohh...

Ich danke ganz besonders meiner Mutter. Ohne Dich wäre das nicht möglich gewesen. Meinem Vater und meiner Schwester möchte ich auch von Herzen danken. Ich bin überglücklich, euch zu haben. Ich liebe euch alle sehr. Natürlich möchte ich auch meiner restlichen Familie danken und freue mich schon auf die nächsten Feste.

Danke

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Entfaltung ist essentiell für die Translokation löslicher Proteine über die Membran der parasitophoren Vakuole im *Plasmodium falciparum*-infizierten Erythrozyten“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort/ Datum

Unterschrift (Vor- und Zuname)

Curriculum Vitae

Nina Gehde

Diplom-Biologin

Universitätsstraße 44

35037 Marburg

Tel.: +49 (0) 6421/898466

Mobil: +49 (0) 176/24452145

Email: NinaGehde@web.de

Persönliche Daten

Geburtstag/ -ort:	08.01.1980, Berlin
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung

Seit 09/2005	Arbeiten zur Dissertation Philipps-Universität Marburg
11/2004-08/2005	Diplomarbeit Philipps-Universität Marburg
10/2002-11/2004	Hauptstudium der Biologie Philipps-Universität Marburg <ul style="list-style-type: none">• Diplomnote: 1,0• Diplomprüfungen abgelegt in den Fächern Parasitologie, Virologie und Mikrobiologie
10/2000-09/2002	Grundstudium der Biologie Universität Konstanz
10/1999-09/2000	Studium der Betriebswirtschaftslehre Fachhochschule Trier
06/1999	Erlangung der Hochschulreife
1990-1999	Auguste-Viktoria Gymnasium Trier
1986-1990	Grund- und Hauptschule Waldrach